ORSAY
SÉRIE A,
Nº D'ORDRE
77

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Claude COSTES

1re THÈSE

RECHERCHES SUR LA BIOSYNTHÈSE ET LE MÉTABOLISME DES CAROTÉNOÏDES DANS LES FEUILLES

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 23 février 1965 *devant la Commission d'Examen :*

MM. LEDERER *Président.*
MOYSE, LAVOREL } *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris-7e

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544306_0031

ORSAY
SÉRIE A,
Nº D'ORDRE
77

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR
LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Claude COSTES

1re THÈSE

RECHERCHES SUR LA BIOSYNTHÈSE ET LE MÉTABOLISME DES CAROTÉNOÏDES DANS LES FEUILLES

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 23 février 1965 *devant la Commission d'Examen :*

MM. LEDERER *Président.*
MOYSE, LAVOREL *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris-7e

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen..... M. ZAMANSKY.

JULIA G.	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et Cristallogr.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie vég. (Orsay).
AUGER	T	Physique quantique et Relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E. N. S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (SPCN)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E. N. S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE	T	Géologie(SPCN) et Sédim.
GAUTHERET	T	Biologie vég. (PCB).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique Enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (PCB).
DANJON	T	Astronomie.
FORTIER	T	Mécanique exp. des Fluides.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (SPCN).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay).
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique et struc.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et Cristallogr.
MATHIEU J.-P.	T	Physique (Optique).
COUTEAUX	T	Biologie animale (PCB).
MAY	T	Zoologie (Orsay).
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Techn. aéronaut.).
BRELOT	T	Calcul diff. et intégral.
NORMANT	T	Synthèse organique.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).
DUGUÉ	T	Statistiques Mathématiques.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale.
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appl.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition.
LELONG	T	Applic. de l'analyse à la géométrie.
SALEM	T	Mathématiques générales
DEVILLERS	T	Anatomie et Histol. comp.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (SPCN).
GLANGEAUD	T	Géographie phys. et Géologie dynamique.
GODEMENT	T	Mathématiques (MPC).
PISOT	T	Tech. mathém. de la Phys.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (MGP).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (MPC).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Électrotechnique génér.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY	T	Biologie végétale (PCB).
PIAUX	T	Chimie (MPC).
BRUN	T	Mécan. théorique des Fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique (Ors.).
Mme DUBREIL	T	Mathém. (Agrégation).
Mme LELONG	T	Mathém. II (E. N. S.).
BELLAIR	T	Géologie (SPCN).
COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.).
MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay)
OLMER	T	Énergétique générale.
ROUAULT	T	Électricité (Orsay).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS	T	Physiologie vég. (Orsay).
CASTAING	T	Physique II Thermod. (Orsay).
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie.
MOYSE	T	Physiologie végét. (Orsay).
NOIROT	T	Évolution des êtres org.
PANNETIER	T	Chimie générale.
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN	T	Chimie quantique.
TEILLAC	T	Physique nucl. et Radioactivité (Orsay).
TONNELAT	T	Biologie physico-chim
VILLE	T	Économétrie.
WILLEMART	T	Chimie (PCB).
DODE	T	Chimie (Orsay).
FREYMANN	T	Recherches physiques.
GUINOCHET	T	Biol. vég. SPCN (Orsay).
ROLLET	T	Chimie minérale.
Mlle JOSIEN	T	Chimie SPCN.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Électronique (Orsay).
CHAPELLE	T	Physique (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay).
GERMAIN	T	Mécan. théor. des fluides.
LUCAS G.	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Phys. des particules fondamentales (Orsay).

BRICART	T	Météorologie et Phys. de l'Atmosphère.
Mme ALBE-FESSARD	T	Psychophysiologie
FRIEDEL	T	Phys. des Solides (Orsay).
JULIA M.	T	Études des Complexes moléculaires.
LENDER	T	Biol. animale (SPCN) (Orsay).
MAGAT	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle QUINTIN	T	Électrochimie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.
BENOIT	T	Physiol. anim. (Orsay).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique.
LEMÉE	T	Écologie végétale (Orsay).
GUÉRIN		Chimie MPC. (Orsay).
CHATELET M.	T	Chimie (PCB).
JEAN	T	Physique nucléaire (Orsay)
MATTLER	T	Physique (SPCN).
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay).
BERTEIN	T	Électronique (Orsay).
BOUISSIÈRES		Radiochimie (Orsay).
Mme COUTURE	T	Thermodynamique et Méc. physique.
ELLENBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe.
FRANC	T	Biol. animale (PCB).
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay).
STOLKOWSKI	T	Physiologie végétale.
ACHER		Chimie biol. (Orsay).
BAUDOIN		Biologie animale (PC B).
BEAUMONT		Biologie animale (SPCN).
BLAMONT	T	Géophysique Ionosphère.
BOURREAU		Botanique.
CURIE D.		Physique (MGP).
DURAND-DELGA	T	Géologie.
FRÉON	T	Chimie organique (Orsay).
HELLER	T	Physiologie végétale.
TORTRAT	T	Calcul des Probabilités.
CAILLEUX		Géologie (SPCN).
MAGNAN	T	Physique (SPCN).
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appl. à la Chim. théor. et à la Phys. nucléaire.
Mlle FOURCROY		Biol. végétale (SPCN).
Mme CHOQUET-BRUHAT	T	Méc. analytique et Méc. céleste.
Mlle VEIL		Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNCK	T	Mécan. phys. et expérim.
LACOMBE	T	Métallurg. des mét. nucl.
BROCHARD	T	Physique PCB. (Orsay).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Mathém. I (Orsay).
MAZET	T	Mécanique générale (Ors).
CAIRE		Géographie phys. et Géol. dynamique.
COMOLET	T	Mécanique des Fluides.
CORABŒUF		Physiologie animale Orsay
DELLOUE		Physique de l'exosphère.
GORENFLOT		Botanique II (Orsay).
HOUILLON		Biologie animale (PCB).
JULLIEN J.		Chimie SPCN(Orsay).
MALGRANGE	T	Tech. math. de la Phys. (Orsay).
OLIVIER		Anthropologie.
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).
BLANC-LAPIERRE	T	Physique E. N. S. (Orsay).
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay).
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay).
SAMUEL	T	Mathématiques E. N. S. féminines.
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay).
THIRY	T	Mécanique céleste.
ABELES		Physique SPCN.
AMAT		Physique PCB.
AUBOIN		Géologie.
Mme BENOIT-GUEUTAL		Physique Nucl. et radio-activité (Orsay).
BOUGIS		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).
BRUHAT	T	Mathématiques MPC.
BRUNN	T	Géologie historique (Orsay).
CHABBAL		Physique MGP (Orsay).
DEHEUVELS	T	Mathématique Prop.
D'ESPAGNAT		Physique théorique (Orsay).
FURON		Géologie SPCN.
Mme GANS	T	Génétique.
GENEVES		Biologie végétale PCB.
GUILBERT		Physique (CUS Orléans)
HUPE		Pétrographie.
HOLLANDE	T	Biologie générale.
LIONS	T	Analyse numérique.
MAITTE		Chimie PCB.
MEYER		Physique propédeutique.
NICOLAS		Géologie appliquée.
PANIGEL		Biologie générale.
RAVIER		Pétrographie.
ROSEAU	T	Mécanique théorique des Fluides.
ROUBINE		Électronique.
SILBER	T	Chimie PCB.
UEBERSFELD	T	Électronique.
YVON	T	Théories Physiques.

Secrétaire général .... R. POULLAIN

RECHERCHES SUR LA BIOSYNTHÈSE ET LE MÉTABOLISME DES CAROTÉNOÏDES DANS LES FEUILLES

A mes parents

A ma femme

PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER. — LES PROBLÈMES POSÉS PAR LES CAROTÉNOÏDES DES FEUILLES 17

A. Structure et répartition des caroténoïdes foliaires.

I *Les hydrocarbures polyéniques* 17
II *Les hydrocarbures polyéniques hydroxylés* 18
III *Répartition et localisation* 19

B. Biosynthèse des caroténoïdes dans les feuilles.

I *Les étapes de la biosynthèse du squelette carboné tétraterpénique* ... 22

Les premières recherches 22
Résultats obtenus par la technique des traceurs radioactifs 23
Hypothèse 26

II *La biosynthèse du β-carotène et des xanthophylles* 27

La cyclisation 27
L'hydroxylation : biosynthèse des xanthophylles 28
L'époxydation : photosynthèse et interconversion entre xanthophylles 30
L'action du milieu climatique sur la biosynthèse des caroténoïdes foliaires 31

C. Conclusions de l'étude bibliographique : les objectifs du travail expérimental.

CHAPITRE II. — LES MÉTHODES ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES 34

A. Matériel végétal.

I *Choix du matériel* 34
II *Variétés et types de culture* 34

B. Techniques chimiques d'analyse et de purification.

I *Extraction des pigments chloroplastiques* 35

II *Les chlorophylles et le phytol* 35

Dosage des chlorophylles 35
Séparation des chlorophylles a *et* b *par chromatographie sur cellulose* 36
Chromatographie des chlorophylles sur papier et sur chromatoplaques d'acide silicique 39
Saponification des chlorophylles a *et* b *et extraction du phytol* 40

III *Les caroténoïdes foliaires* 40

Séparation des caroténoïdes par chromatographie sur cellulose. 40
Dosage des caroténoïdes 41
Chromatographie sur papier et sur chromatoplaques 45
Purification des caroténoïdes séparés sur cellulose 46
Fraction A : β-carotène 47
Fraction A' 51
Fraction B : lutéine et zéaxanthine 51
Fractions B', C et D : autres xanthophylles 52

Identification des pigments 52

Réactions colorées 52
Spectres d'absorption dans le visible 53
Réactions d'isomérisation : identification de l'époxylutéine et de la violaxanthine 53

C. Techniques de mesure de la radioactivité du carbone-14 et du tritium.

I *Mesure de la radioactivité avec un compteur de Geiger-Müller* 57

II *Mesure de la radioactivité avec un compteur à scintillation liquide* 58

Principe et caractéristiques des scintillateurs 58
Extinction. Décoloration des pigments 58
Conditions des mesures de la radioactivité de ^{14}C *et de* ^{3}H 60
Signification des mesures de radioactivité. Mesure des faibles radioactivités par scintillation liquide 62
Calcul des radioactivités spécifiques. Précision 63
Établissement d'un bilan de radioactivité 64

D. Techniques d'incorporation de métabolites dans les feuilles et d'incubation par les chloroplastes.

I *Incorporation dans les feuilles par flottage* 65

II *Incorporation de* $^{14}CO_2$ *par photosynthèse* 66

III *Infiltration sous vide dans les feuilles de plantules étiolées de Maïs.* 67

Description de la technique 67
Conditions expérimentales 68

IV *Incubation de métabolites radioactifs avec des suspensions de chloroplastes* 69

E. Synthèse du géranylgéraniol. 71

F. Tritiation du géranylgéraniol et du géranyllinalool. 73

G. Techniques de biosynthèse des caroténoïdes marqués au ^{14}C.

I *Préparations à partir de feuilles de Tomate : β-carotène, lutéine, violaxanthine* 76
II *Préparations à partir de racines de Carotte : phytofluène, ζ-carotène et α-carotène* 76
III *Préparation à partir de fruit de Tomate : lycopène* 80
IV *Préparation de zéaxanthine ^{14}C à partir de calice de* Physalis franchetii 85

CHAPITRE III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION 88

A. Action de la lumière sur les teneurs en caroténoïdes dans les feuilles et dans les chloroplastes.

I *Feuilles de Tomate* 89
II *Jeunes feuilles étiolées de Maïs* 91
III *Chloroplastes isolés* 92

B. Biosynthèse du phytol des chlorophylles et du squelette tétraterpénique des caroténoïdes.

I *Rôle précurseur du CO_2, de l'acide acétique et de l'acide mévalonique* 94

Biosynthèse des pigments à partir de $^{14}CO_2$ dans les feuilles de Tomate 94
Biosynthèse des caroténoïdes à partir de $^{14}CH_3—COO^-$ 99
Feuilles de Tomate 99
Feuilles étiolées de Maïs verdissant à la lumière 101
Biosynthèse des caroténoïdes à partir d'acide mévalonique 101
Feuilles de Tomate 101
Feuilles étiolées de Maïs verdissant à la lumière 101

II *Rôle du géranylgéraniol et du géranyllinalool* 102

Expériences de compétition métabolique entre un précurseur radioactif et les alcools diterpéniques 104

Incorporation d'alcools diterpéniques tritiés 108
Recherche du géranylgéraniol in vivo 111

III *Conclusions sur la biosynthèse des chaînes carbonées du phytol et des caroténoïdes* 115

C. Métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles.

I *Évolution de la radioactivité spécifique des caroténoïdes après incorporation d'acétate 2-^{14}C dans les feuilles* 117

II *Incubation de caroténoïdes radioactifs avec des chloroplastes* 125

Transformation de certains polyènes acycliques en carotène et en xanthophylles 125
Biosynthèse des caroténoïdes par les chloroplastes isolés, à partir d'acide mévalonique 125
Transformation du phytofluène en caroténoïdes par les chloroplastes 125
Transformation du lycopène en caroténoïdes par les chloroplastes .. 129
Transformation de carotènes en xanthophylles 129
Transformation des xanthophylles par les chloroplastes 131
La lutéine 131
La violaxanthine 132
La zéaxanthine 133
Remarque 134

III *Répartition de ^{3}H entre les caroténoïdes foliaires, à partir d'eau tritiée* 135

Eau tritiée métabolisée par des folioles de Tomate 135
Incubation d'eau tritiée en présence de chloroplastes 138
Remarque 141

IV *Conclusions sur le métabolisme des caroténoïdes* 141

La cyclisation 141
Les réactions d'oxydation des caroténoïdes 142
Les réactions de réduction 142

D. Conclusion générale et Perspectives 145

Résumé 150
Références bibliographiques 151

AVANT-PROPOS

Ce travail a été accompli dans les laboratoires de la Station centrale de Physiologie végétale de l'I. N. R. A., à Versailles. Je voudrais d'abord remercier M. Bustarret, Directeur Général de l'I. N. R. A. et M. Coïc, Directeur de la Station de Physiologie végétale, de m'avoir permis d'entreprendre et de mener à bien ces longues recherches. M. Coïc a toujours mis à ma disposition les meilleurs moyens matériels et humains et je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance.

M. le Professeur Lederer, Directeur de l'Institut de Chimie des Substances naturelles, a orienté initialement ce travail. Depuis 1960, il n'a cessé de le suivre, de me faire profiter de ses vastes connaissances, de ses critiques et de ses suggestions. Il m'a toujours accueilli avec bienveillance et n'a jamais hésité à m'accorder une aide matérielle en me permettant de réaliser certaines expériences dans son laboratoire. Enfin il m'a fait l'honneur de présider le Jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Je remercie M. le Professeur Moyse, Directeur du Laboratoire de Photosynthèse d'avoir accepté d'être de ce Jury et d'avoir analysé ce travail avec beaucoup de minutie : je lui dois des conseils très précieux.

Je remercie également M. le Professeur Lavorel, de s'être intéressé à mes résultats, d'en avoir apprécié certains prolongements et d'avoir accepté de juger cette thèse.

M. le Professeur Goodwin, de l'*University College of Wales*, m'a accueilli dans son laboratoire, et m'a fait profiter de ses critiques et de son expérience de la chimie des caroténoïdes : je l'en remercie bien vivement.

Au cours de ce travail, il m'est souvent arrivé de solliciter conseils ou assistance. M. Morel, Directeur de recherches à l'I. N. R. A. m'a conseillé avec bienveillance et je tiens à dire ce que je dois aux fructueuses discussions scientifiques avec mes collègues du C. N. R. A. Que Mme Deroche et MM. Baudet, Chaussidon, Jolivet et Mossé voient ici une marque de ma reconnaissance.

Enfin je veux particulièrement remercier Mlle Lessertois dont l'assistance technique a efficacement contribué à la réalisation de ce travail, ainsi que M. Mercier de Gif-sur-Yvette qui m'a aidé dans la synthèse du géranylgéraniol, M. Lesaint qui a monté plusieurs appareils, M. Riedacker qui a fait de nombreuses traductions de documents russes, M. Ermolieff qui m'a aidé dans les cultures en serre, et Mmes Cordillot et Cornu qui ont assuré le travail de dactylographie.

INTRODUCTION

Depuis qu'en 1831 WACKENRODER a extrait pour la première fois un mélange de carotènes à partir de la Carotte, on a découvert environ 100 caroténoïdes dans le monde vivant, sans compter les stéréoisomères. Ils sont surtout nombreux chez les végétaux où BERZELIUS (1837) a le premier isolé les « xanthophylles » des feuilles jaunes d'automne. Il y a déjà cent ans qu'on a reconnu l'existence de ces pigments jaunes dans les feuilles vertes (FREMY, 1860 ; STOKES, 1864) mais c'est depuis les travaux de TSWETT (1911) que la technique de chromatographie d'adsorption a permis à la chimie des caroténoïdes de faire de grands progrès. Vers 1930, les structures sont déterminées et de nouveaux pigments sont découverts par KARRER et par KUHN et LEDERER. L'ensemble des travaux classiques réalisés sur les caroténoïdes sont résumés dans trois ouvrages que nous avons souvent consultés et qui ont respectivement pour auteurs P. KARRER et E. JUCKER (1950), T. W. GOODWIN (1952) et L. ZECHMEISTER (1960).

Dans le monde végétal on trouve ces pigments chez tous les groupes (Bactéries, Champignons, Algues, Cryptogames vasculaires, Gymnospermes, Angiospermes) et dans tous les organes (feuilles, tiges, racines, fleurs, graines et fruits). Or dans les organes chlorophylliens, les caroténoïdes sont toujours étroitement associés aux chlorophylles, et ces organes ne peuvent demeurer vivants à la lumière, en leur absence. C'est une loi qui ne connait pas d'exception chez les végétaux supérieurs et qui permet de penser pour ces pigments à un rôle dans la physiologie des organes capables de photosynthèse. Mais si l'on prête plusieurs fonctions physiologiques à ces pigments, le mécanisme en est inconnu. Or le mécanisme d'intervention des chlorophylles dans la photosynthèse est très étudié et, paradoxalement, les possibilités réactionnelles des caroténoïdes étaient mal connues chez les Phanérogames quand nous avons commencé cette étude. Dans le présent travail nous pensons apporter une contribution à la connaissance du métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles, connaissance qui nous semble indispensable à la compréhension de leur rôle.

Après un rappel des travaux réalisés sur leur biosynthèse, nous essaierons, dans une première partie, de bien mettre en lumière les problèmes posés par les caroténoïdes foliaires. Dans une seconde partie, nous exposerons les méthodes et techniques que nous avons dû mettre au point pour mener à bien nos recherches. Enfin une dernière partie consistera en l'exposé critique des résultats, suivi des conclusions et hypothèses que nous croyons pouvoir en tirer.

CHAPITRE PREMIER

LES PROBLÈMES POSÉS PAR LES CAROTENOIDES DES FEUILLES

A. Structure et répartition des caroténoïdes foliaires

Quand, il y a plus de cinquante ans, on a découvert les caroténoïdes dans les feuilles vertes, on a cru reconnaître seulement deux corps : le carotène et la xanthophylle. Depuis on s'est aperçu que ces deux entités recouvraient en réalité une dizaine de substances qui ont un squelette carboné commun, celui des tétraterpènes.

Suivant leur degré d'oxydation on les classe en deux grands groupes dont nous allons passer en revue les constituants trouvés jusqu'à maintenant dans les feuilles ou les algues vertes. Nous rappelons dans le tableau 1 la structure de ces corps et la manière de numéroter leurs atomes de carbone.

I. — Les hydrocarbures polyéniques

Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques.

Les polyènes acycliques.

Le *phytoène* a été trouvé dans les feuilles de luzerne par Rabourn et Quackenbush (1953) et plus récemment par Mercer, Davies et Goodwin (1963), en très faible quantité : moins de 5 µg par g de feuille.

Le *phytofluène* a été observé dans les tissus chlorophylliens de 21 espèces représentant 18 familles de plantes vasculaires (Zechmeister et Karmakar, 1953 ; Mercer, Davies et Goodwin, 1963). Les teneurs sont très faibles (0,1 à 0,2 µg par g de feuille fraîche) mais l'existence de ces caroténoïdes dans les feuilles peut être considérée comme générale. En revanche, nous ne connaissons pas de travaux rapportant la présence de *ζ-carotène* ou de *neurosporène* dans les tissus foliaires. Cependant il faut signaler que Claes (1954) a trouvé dans des mutants de *Chlorella* du ζ-carotène à côté de phytoène et de phytofluène.

Quant au *lycopène*, Claes l'a identifié chez un mutant de *Chlorella* (1956) ; Lefort (1959) l'a rencontré dans les feuilles de mutants de Tomate *Xantha* et *Albina*, et Signol (1958) l'a observé dans certaines zones de feuilles de Maïs dont la synthèse des pigments est inhibée par l'acide 3 (α-iminoéthyl)-5 méthyl tétronique .

Il semble donc que dans les feuilles l'existence des polyènes tétraterpéniques acycliques ne puisse être contestée : mais nous devons remarquer qu'ils ne s'accumulent pas dans les conditions normales et qu'ils peuvent apparaître en grande

quantité à l'occasion d'une mutation ou d'un inhibition. Cette propriété a conduit de nombreux auteurs à penser qu'il s'agit de substances intermédiaires, rapidement métabolisées.

Les polyènes monocycliques.

Trouvé récemment dans les grains de Maïs, le *β-zéacarotène* avait été caractérisé par Claes (1957) dans le mutant 5 520 de *Chlorella* (pigment X). Goodwin (1963) a identifié le pigment X de Claes au β-zéacarotène.

Les polyènes bicycliques.

Ce sont les plus anciennement connus.

Le *β-carotène* est universellement réparti dans les feuilles et en quantité relativement abondante : de 30 à 100 μg par g de matière fraîche. C'est le principal hydrocarbure polyénique des chloroplastes.

L'*α-carotène*, au contraire, ne se trouve pas dans toutes les feuilles et il ne s'accumule pas (Mackinney, 1935). Ayant examiné les feuilles de 210 espèces choisies parmi 95 familles d'Angiospermes, Strain (1958) a trouvé la répartition suivante des teneurs en α-carotène :

nulle	78	37,2 %
traces (moins de 1 p. 100 des caroténoïdes)	61	29 %
de 1 à 10 %	47	22,4 %
plus de 10 %	24	11,4 %

Il y a donc environ 66 p. 100 des espèces dont les feuilles ne contiennent que des traces ou pas de carotène α.

II. — Les hydrocarbures polyéniques hydroxylés

Ce sont les xanthophylles dont certaines sont époxydées. Elles peuvent être de structure β ou de structure α.

Les xanthophylles de structure β.

Leur structure dérive de celle du β-carotène. Ce sont :

— *La zéaxanthine.* — (3,3'-dihydroxy β-carotène) n'existe qu'en faible quantité dans la plupart des feuilles : moins de 5 μg par g de matière fraîche.

— *La violaxanthine.* — (3,3'-dihydroxy-5,6-5',6'-diépoxy β-carotène) : on la trouve dans toutes les feuilles vertes (10 à 40 μg par g de feuille).

— *La néoxanthine.* — (3,3',5'-trihydroxy-6'-hydro-5,6-époxy β-carotène) dont la structure vient d'être proposée par Goldsmith et Krinsky (1960) est également très répandue (5 à 20 μg par g de feuille).

On rencontre également des traces de *cryptoxanthine* (3-hydroxy β-carotène) dans certaines feuilles. Quelques espèces accumulent la *rhodoxanthine* (3,3'-dioxoretro β-carotène) dans leurs feuilles : cela a été reconnu chez *Potamogeton amplifolius* (Dutton et Juday, 1944), chez *Cryptomeria japonica* (Lipmaa, 1926), chez certains Ptéridophytes et récemment dans les feuilles de plantules d'*Agatha australis* (Peterson, 1963). Notons que chez certaines algues vertes, comme *Euglena heliorubescens*

(Tischer, 1936), ou *Hematococcus pluvialis*, on rencontre des quantités importantes d'*astaxanthine* (3,3' dihydroxy-4, 4' dioxo β-carotène) notamment pendant la phase d'enkystement (Tischer, 1937 ; Saccone, 1959) : à notre connaissance cette xanthophylle de structure β n'a pas été trouvée jusqu'à maintenant dans les tissus foliaires.

Les xanthophylles de structure α.

Leur structure les rattache à l'α-carotène.

— *La lutéine.* — (3,3'-dihydroxy α-carotène) est la plus largement répandue et la plus abondante des xanthophylles : de 100 à 200 μg par g de matière fraîche.

— *L'époxylutéine.* — (3,3'-dihydroxy-5,6-époxy α-carotène) est également largement distribuée dans les organes chlorophylliens mais en plus petite quantité que la violaxanthine (5 à 10 μg par g de feuille). Sa teneur varie avec les saisons dans les feuilles (Goodwin, 1958 *a*). On rencontre dans certaines feuilles la *flavoxanthine* (3,3' dihydroxy-5,8 époxy α-carotène) qui est un isomère de l'époxylutéine.

III. — Répartition et localisation

Dans les pétales de fleur, dans la racine de Carotte, dans le fruit de la Tomate, les caroténoïdes sont cristallisés et les cristaux sont agglomérés dans les chromoplastes, parfois associés à des protéines, à de l'ARN, à de l'ADN et à des phospholipides (Straus, 1956). Il en va de même chez les feuilles sénescentes et les plantules étiolées (Goodwin, 1958 *a*).

Dans les feuilles vertes, les caroténoïdes sont constitutifs des chloroplastes (Goodwin, 1958 *a*). Ils sont associés aux chlorophylles, aux quinones et aux lipoprotéines dans les lamelles chloroplastiques. Granick (1961) estime que les pigments se répartissent en moyenne de la façon suivante (en p. 100 du poids sec de chloroplastes) :

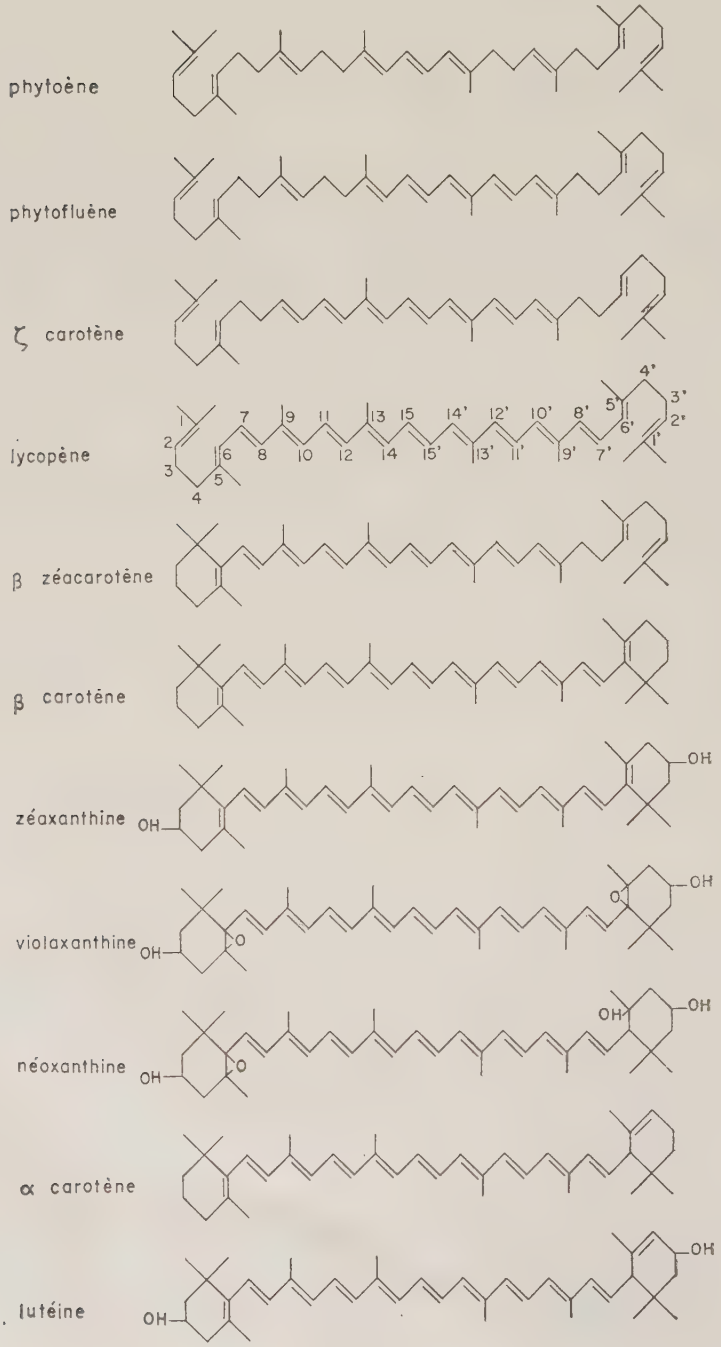
	%	
Protéines :	35-55	
Lipides :	20-30	
Chlorophylles :	9	Chlorophylle a : ~ 3/4 Chlorophylle b : ~ 1/4
Caroténoïdes :	4,5	Xanthophylles : ~ 3/4 Carotènes : ~ 1/4

Plus récemment Lichtenthaler et Park (1963) ont montré dans les lamelles des chloroplastes d'Épinard que les proportions relatives des pigments sont les suivantes (en molécules par atome de Manganèse) :

Chlorophylles	115	
chlorophylle *a*		80
chlorophylle *b*		35
Caroténoïdes	24	
β Carotène		7
lutéine		11
violaxanthine		3
néoxanthine		3
Quinones	23	

TABLEAU I

Structure des caroténoïdes des cellules chlorophylliennes



Qualitativement cette répartition est sensiblement la même pour tous les organes chlorophylliens. De nombreux auteurs ont rapporté la présence des 4 principaux caroténoïdes (β-carotène, lutéine, violaxanthine et néoxanthine) dans les feuilles des Phanérogames (Zscheile et *al.*, 1942 ; Moster, Quackenbush et Porter, 1952 *a* ; Strain, 1948 et 1958 ; Kay et Phinney, 1956 *a* et *b* ; Sapozhnikov et *al.*, 1956 ; Goodwin, 1958 *a* ; Costes, 1958 ; Hager, 1957 *b* ; Grob et *al.*, 1961 *b* ; Schotz, 1962) et chez *Chlorella* (Blass, Anderson et Calvin, 1959 ; Allen, Goodwin et Phagpolngarm, 1960 ; Iwata, Nakata et Sakurai, 1961).

La distribution de ces caroténoïdes attire l'attention sur au moins deux points remarquables.

— En premier lieu, non seulement les chlorophylles et les caroténoïdes sont toujours associés dans les structures des organismes normalement viables, mais les variations des teneurs en chlorophylles sont souvent les mêmes que celles des teneurs en caroténoïdes dans les feuilles sous l'action des facteurs du milieu (lumière, température). Beck et Redman (1940) chez le Trèfle, puis Hager (1957 *a*) chez *Veratrum album* ont remarqué le parallélisme de l'action des facteurs climatiques sur les teneurs en chlorophylles, en carotènes et en xanthophylles au cours de l'année. Dans les feuilles de Tabac en cours de maturation (Jeffrey et Griffith, 1947) et dans les feuilles de Maïs placées à l'obscurité (Frank et Kenney, 1955), l'évolution des trois groupes de pigments est parallèle. Ces faits suggèrent l'existence d'un maillon commun à la chaîne de biosynthèse des chlorophylles et à celle des caroténoïdes. Cette hypothèse a été formulée par plusieurs auteurs (Ruzicka, 1953 ; Demole et Lederer, 1958 ; Shlyk et Godnev, 1958 ; Godnev et Rotfarb, 1962 ; Costes, 1962) : un précurseur en C_{20} donnerait naissance à la fois au phytol et aux caroténoïdes. L'un des objectifs de ce travail est de lui donner un support expérimental.

— La seconde observation est liée à la répartition des caroténoïdes en fonction de leur structure chimique. Dans toutes les feuilles vertes, le principal carotène est le β-carotène et on ne trouve pas d'α-carotène, ou seulement à l'état de traces. En revanche, la xanthophylle principale est la lutéine, de structure α, alors que la zéaxanthine (de structure β) n'existe qu'en très petite quantité. Il y a là un phénomène général et inexpliqué : dans les feuilles vertes, le principal produit d'hydroxylation des chaînes alicycliques tétraterpéniques est le plus souvent de structure α, alors que le principal hydrocarbure alicyclique est de structure β. Cette simple remarque nous a conduit à rechercher ce qui, au cours de la biosynthèse, pouvait expliquer cette particularité.

B. Biosynthèse des caroténoïdes dans les feuilles

Le mécanisme de biosynthèse des caroténoïdes dans les feuilles est encore très mal connu. Les quelques résultats dont on dispose sur la formation de ces corps ont été obtenues avec des Levures, des Bactéries, des Champignons, la racine de Carotte ou le fruit de la Tomate. Les organismes photosynthétiques où l'on ait étudié la synthèse du β-carotène sont principalement des algues vertes : *Chlorella* et *Scenesdesmus*. Chez les Phanérogames, ce sont surtout les feuilles de plantules étiolées de Blé ou de Maïs qui ont servi de matériel d'étude. Peu de chercheurs ont travaillé sur des feuilles adultes et par manque d'une technique appropriée, aucune recherche n'a été faite sur la synthèse du carotène et de chacune des xanthophylles avant 1952

(Moster et Quackenbush 1952 *a*). De même, jusqu'au présent travail, *l'étude simultanée* de la biosynthèse de chacun de ces pigments séparés chez les feuilles vertes n'avait jamais été entreprise par la technique des traceurs radioactifs (Costes, 1963 *b*).

I. — Les étapes de la biosynthèse du squelette carboné tétraterpénique

Les premières recherches

La première approche systématique de la biosynthèse des caroténoïdes foliaires a été faite par Bandurski (1949). Avec des fragments de limbe de Haricot en survie sur milieu nutritif cet auteur a montré que :

— la lumière est nécessaire à l'accumulation des xanthophylles ; de même la biosynthèse du carotène à l'obscurité est possible mais elle est stimulée par la lumière. La photosynthèse semble donc avoir une incidence directe, mais partielle sur la caroténogenèse ;

— l'hydroxylamine et le fluorure de sodium inhibent la caroténogenèse dans la feuille, ce qui confirme le rôle de la photosynthèse et met en évidence celui de la respiration dans la biosynthèse des caroténoïdes ;

— le saccharose ou le glucose apportés au milieu nutritif stimulent la caroténogenèse dans les limbes. Cette stimulation est inhibée par le fluorure mais non par l'hydroxylamine : c'est donc la dégradation respiratoire des glucides qui semble donner naissance aux métabolites précurseurs des caroténoïdes.

Il propose le premier schéma général permettant de situer la biosynthèse du carotène dans le métabolisme cellulaire :

$$CO_2 \xrightarrow[\text{(lumière)}]{\text{photosynthèse}} \text{sucres} \longrightarrow \text{précurseurs } P_1 \ldots n \longrightarrow \text{carotène}$$

sucres dans milieu nutritif.

Sur des plantules de blé étiolé, Beekman (1953-1954), étudiant les variations de la teneur en caroténoïdes, montre également que la dégradation aérobie des glucides est nécessaire à la formation de ces pigments. Démontrant expérimentalement que la synthèse des caroténoïdes foliaires est inhibée par le 2,4-dinitrophénol 10^{-2} M dans le milieu nutritif, sans que la germination soit atteinte, cet auteur pressent que les phosphorylations sont indispensables à leur biosynthèse. D'après Elliot et Kalnitzki (1950) l'acide fluoroacétique 10^{-3} M inhibe la formation des caroténoïdes et cette inhibition peut être levée par l'adjonction d'acide citrique 10^{-3} M au milieu de culture des plantules (Beekman, 1953). Ce blocage de la caroténogenèse par l'acide fluoroacétique 10^{-4} M a été confirmé plus tard par Faludi, Daniel et Kelemen (1960) avec des feuilles de Maïs en survie sur milieu nutritif.

Ces résultats, bien que partiels, indiquent clairement le rôle essentiel des sucres, de l'acétate et des acides du cycle tricarboxylique dans la caroténogenèse foliaire.

Parallèlement un grand nombre de substances sont éprouvées pour leur pouvoir caroténogénétique (Mase, 1959). Harashima (1960) a mis en évidence le rôle stimulateur de l'acide β-hydroxy β-méthylglutarique sur la caroténogenèse dans des cultures de fragments de Carotte. Étudiant par ailleurs l'action de plusieurs acides

aminés, Goodwin et Lijinsky (1952) ont bien montré que le glycocolle, la L-valine ou la L-leucine, apportés au milieu de culture de *Phycomyces blakesleanus* augmentent fortement la synthèse du β-carotène dans ce mycélium. Les résultats de ces essais semblent établir que le β-carotène peut être synthétisé non seulement à partir de glucides ou de lipides, mais également de précurseurs azotés. Cependant ces données sont encore bien partielles, ne portant que sur le β-carotène et correspondant à des expériences menées sur des organismes non chlorophylliens.

Quant à la manière dont est construite la chaîne carbonée tétraterpénique alicyclique, il faut attendre les travaux de Mackinney et *al.* (1952, 1953, 1954), Chichester et *al.* (1954) qui constituent le premier essai expérimental susceptible de donner une réponse à cette question. Sur *Phycomyces*, ils montrent que la β-ionone stimule la production du β-carotène alors que la méthylhepténone augmente la teneur en phytofluène et en ζ-carotène. Ces résultats permettent alors de penser que la β-ionone est un précurseur des extrémités cycliques de la molécule de β-carotène. Mais quand Chichester, Wong et Mackinney (1954) essayent de diluer par la β-ionone la radioactivité incorporée dans le β-carotène de *Phycomyces* à partir de fructose ^{14}C, ils n'observent aucune dilution isotopique du ^{14}C, bien que la teneur en β-carotène soit multipliée par 4 en présence de β-ionone. Ils concluent que l'effet stimulant de la β-ionone est indirect et que ce corps ne peut être considéré comme un précurseur biologique du β-carotène. Cette expérience illustre l'intérêt de la méthode des traceurs dans une étude de biosynthèse. C'est effectivement cette méthode qui a permis de mieux connaître le mécanisme de synthèse *in vivo* des tétraterpènes.

Résultats obtenus par la technique des traceurs radioactifs

Travaux réalisés sur des organismes non chlorophylliens.

Là encore, les premières expériences n'ont pas été faites avec des organismes chlorophylliens. Dès 1950, Schopfer et Grob observent que si le lactate est la seule source de carbone, *Phycomyces blakesleanus* synthétise peu de β-carotène : l'acétate favorise la caroténogenèse et peut être la seule source de carbone dans le milieu nutritif (Schopfer et Grob, 1952). Mais Grob et *al.*, sont les premiers à démontrer, par la technique des traceurs radioactifs, le rôle précurseur de l'acétate (1951) et du mévalonate (1957) dans la biosynthèse du β-carotène chez *Mucor hiemalis*. Puis ces résultats sont confirmés chez *Phycomyces blakesleanus* (Braithwaite et Goodwin, 1957, 1960 *a*) et dans les tissus de la racine de Carotte (Braithwaite et Goodwin, 1957, 1960 *b*). Également chez *Phycomyces*, Yokoyama, Chichester et Mackinney (1960) montrent que les degrés d'incorporation dans le β-carotène se classent de la façon suivante par ordre croissant : acétate 2-^{14}C, glutarate 3-^{14}C et mévalonate 2-^{14}C. Puis Yokoyama et *al.* (1962) réussissent la biosynthèse du β-carotène à partir du mévalonate 2-^{14}C et d'un extrait cellulaire de *Phycomyces* : ils démontrent que Mg^{++} l'ATP et le CoA sont des cofacteurs indispensables aux réactions et que l'ion Mn^{++} accélère la synthèse. Par ailleurs Suzue (1960) observe la biosynthèse du phytoène à partir d'acide mévalonique 2-^{14}C chez un mutant de *Staphylococcus aureus* : dans cette réaction l'ATP, Mg^{++} et Mn^{++} se révèlent nécessaires.

Chez le fruit de la Tomate, on montre que l'acétate et le mévalonate sont des précurseurs du lycopène (Braithwaite et Goodwin, 1960 *c*), mais également le CO_2

et le glucose (Purcell et Thompson, 1961) dont le rôle essentiel dans la caroténogenèse est ainsi confirmé par une méthode isotopique.

Enfin récemment, on a reconnu le rôle des esters phosphoriques d'alcools terpéniques en C_5, C_{10} et C_{15}. C'est d'abord le pyrophosphate de farnésyle 5, 10, 15-^{14}C dont Yamamoto et *al.* (1961) observent l'incorporation dans le phytoène, le phytofluène, le β-carotène et le lycopène de *Phycomyces*. Puis on démontre l'incorporation de pyrophosphate de Δ 3-isopenténylе uniformément marqué au ^{14}C, dans le lycopène par un homogénéisat de fruit de Tomate (Varma et Chichester, 1962 *a*). Ces auteurs reconnaissent en même temps le rôle du géraniol et peut-être du citral dans la synthèse du β-carotène chez la Carotte (Varma et Chichester, 1962 *b*).

Travaux réalisés sur des organismes chlorophylliens.

Les travaux rapportant des incorporations de métabolites marqués au ^{14}C dans les caroténoïdes de systèmes chlorophylliens sont plus rares.

Quelques expériences ont été faites sur les unicellulaires capables de photosynthèse. Chez *Euglena gracilis*, Steele et Gurin (1960) montrent que l'acétate 1-^{14}C et 2-^{14}C, le ββ′-diméthyl-acrylate-^{14}C, le β-hydroxy β-méthylglutarate-^{14}C et surtout le mévalonate 2-^{14}C sont bien utilisés dans la synthèse du β-carotène. En revanche c'est le ββ′-diméthylacrylate qui paraît rapidement intégré dans le β-carotène de *Chlorella*, alors que dans les mêmes conditions expérimentales, le mévalonate est très peu incorporé (D. G. Anderson, Norgard et Porter, 1960). Un seul travail rapporte le marquage relatif des carotènes β et α et de chaque xanthophylle de *Chlorella* après une heure de photosynthèse en présence de $^{14}CO_2$: la radioactivité spécifique varie de 1 000 pour les carotènes à 75 pour la lutéine et la violaxanthine, jusqu'à une valeur inférieure à 10 pour l'époxylutéine (Blass, J. M. Anderson et Calvin, 1959). Jusqu'à maintenant, c'est le seul travail portant sur les xanthophylles séparées.

Chez les feuilles vertes, les chercheurs se sont d'abord intéressés à la fraction du carbone fixé par photosynthèse et qui s'oriente vers les pigments. Roux et Husson (1952 *a*) ont montré les premiers que les carotènes sont plus rapidement synthétisés que les chlorophylles dans les feuilles de *Physalis* à partir de $^{14}CO_2$ à la lumière. Shlyk et Godnev (1958) ont attiré l'attention pour la première fois sur la différence entre les radioactivités du β-carotène et de toutes les xanthophylles synthétisés à partir de $Na_2{}^{14}CO_3$ par les feuilles de *Ceratophyllum demersum*. Ce fait a été confirmé par Billot et Leroy (1960) dans les feuilles de Haricot en voie de verdissement à la lumière. Mais dans ces trois derniers travaux, le β-carotène n'a pas été purifié et il est fort probable que les activités spécifiques calculées pour ce pigment, soient fausses par excès.

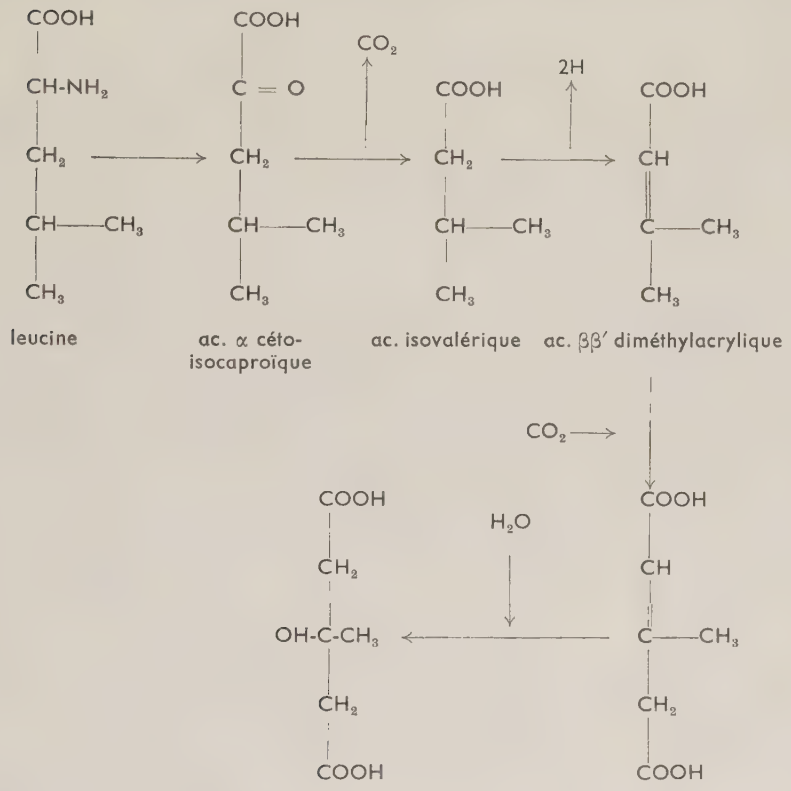
Dans les plantules étiolées de Maïs verdissant à la lumière, Goodwin (1958 *b* et *c*) rapporte que si le $^{14}CO_2$ est rapidement incorporé dans le β-carotène, il n'en est pas de même pour l'acétate 2-^{14}C et le mévalonate 2-^{14}C. Cependant sur le même matériel végétal, nous avons trouvé (Costes, 1962) des taux d'incorporation d'acétate 2-^{14}C dans le β carotène en présence de *Tween* 80, supérieurs à ceux obtenus par Goodwin. Récemment, les travaux de Jolchine (1962) ont montré que la biosynthèse de caroténoïdes peut se faire dans les chloroplastes. Confirmant ce point, Goodwin (1963) ajoute que l'acétate et le mévalonate pénètrent moins facilement

que CO_2 dans les structures des plastes : ces métabolites sont alors utilisés en priorité à la synthèse des phytostérols qui a lieu dans le cytoplasme cellulaire.

Certains acides aminés marqués se sont révélés d'excellents précurseurs du β-carotène. Si les carbones 1 et 2 de l'acide glutamique 1, 2-^{14}C infiltré dans les feuilles de Maïs ne se retrouvent pas dans les caroténoïdes au bout de 48 heures (Roux et Husson, 1952 *b*), l'alanine-2-^{14}C confère au β-carotène des feuilles de kok-sagyz une

TABLEAU 2

Transformation de la leucine en acide β-hydroxy-β-méthyl-glutarique



activité spécifique 1,9 fois supérieure à celle qu'il a à partir de l'acétate-2-^{14}C (Shilov, 1957). Par ailleurs la proline uniformément marquée au ^{14}C est utilisée par des plantules de Topinambour pour synthétiser du β-carotène et de la lutéine (Duranton et Maille, 1962). Récemment Ehrenberg et Daniel (1962) ont montré que la leucine est un précurseur du β-carotène des feuilles d'Orge. Ce dernier point nous paraît particulièrement important car il permet de penser que le mécanisme d'utilisation de la leucine pour la synthèse des caroténoïdes, établi chez *Phycomyces blakesleanus* (Chichester et *al.*, 1955 ; Goodwin, 1960), fonctionne également dans les feuilles vertes (tabl. 2).

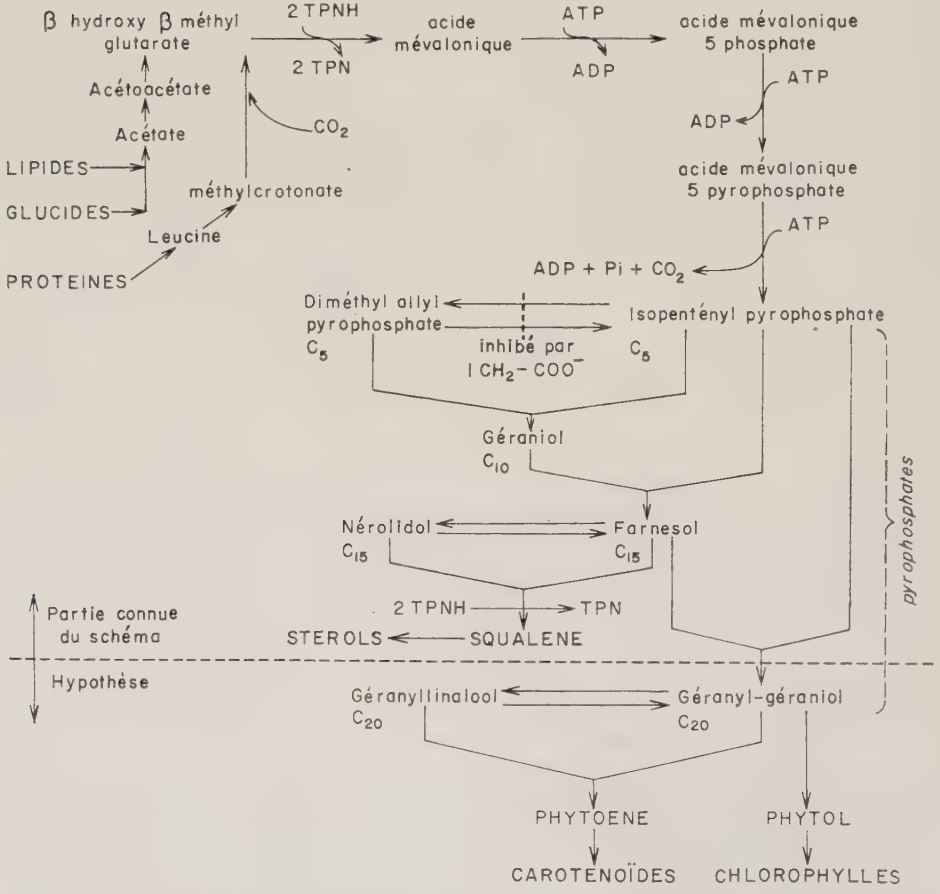
Enfin D. G. Anderson et Porter (1962) viennent de mettre en évidence une incorporation de pyrophosphate d'alcools terpéniques marqués au ^{14}C dans le phytoène, le phytofluène et le β-carotène de chloroplastes isolés de fruits de Tomate et de feuilles d'Épinard.

Hypothèse

L'ensemble de ces travaux fait apparaître un parallélisme étroit entre le mécanisme de biosynthèse du β-carotène et celui des stérols. Nos connaissances sur la biosynthèse des stérols résultent principalement des travaux de Rilling, Tchen

TABLEAU 3

Schéma de biosynthèse des composés terpéniques



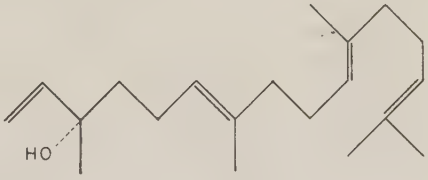
et Bloch (1958), de Lynen et Henning (1961) et de Popjak et Cornforth (1960). Le schéma de biosynthèse ainsi dégagé figure dans le tableau 3.

Par ailleurs des travaux récents montrent que les acides acétique et mévalonique

sont des précurseurs du phytol des chlorophylles en même temps que des caroténoïdes et des stérols (Costes, 1962 ; Fisher et *al.*, 1962 ; Mercer et Goodwin, 1962).

Devant ces résultats nous avons repris l'hypothèse formulée par Wagner-Jauregg (1932), Kuhn et Grundmann (1932) et Ruzicka (1953) selon laquelle le géranylgéraniol donnerait naissance à la fois au phytol par réduction et aux caroténoïdes par déshydratation et dimérisation. Mais de même que le squalène, précurseur aliphatique en C_{30} des stérols, semble résulter de la condensation asymétrique d'une molécule de farnésol et d'une molécule de nérolidol, nous avons pensé que la chaîne tétraterpénique se synthétise par condensation d'une molécule de géranylgéraniol et d'une molécule de géranyllinalool comme nous le formulons dans le tableau 3.

Géranylgéraniol



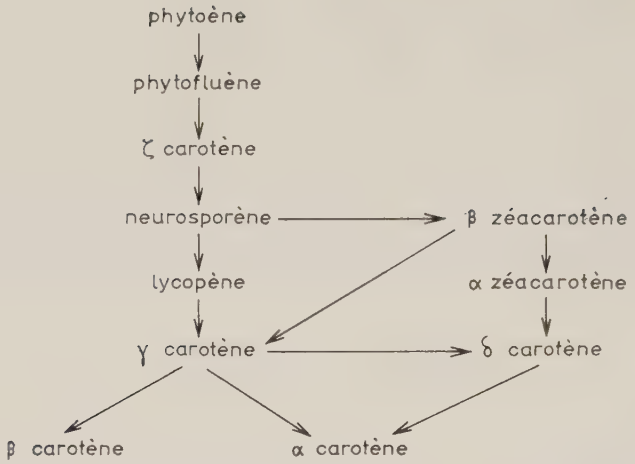
Géranyllinalool

L'isolement du géranyllinalool dans les pétales de jasmin (Demole et Lederer, 1958) et du pyrophosphate de géranylgéraniol à partir de *Neurospora crassa* (Grob, Kirshner et Lynen, 1961 *a*) permet d'étayer cette hypothèse. Et très récemment on vient d'obtenir du géranylgéraniol et du géranyllinalool radioactifs à partir d'acide mévalonique-2-^{14}C, de pyrophosphate de farnésyle 4, 8, 12-^{14}C et d'extraits enzymatiques de Carotte et de Tomate (Beeler, D. G. Anderson et Porter, 1963). Dans la première partie du présent travail, nous nous proposons de donner des preuves expérimentales de cette hypothèse en étudiant simultanément la biosynthèse des carotènes, des xanthophylles et du phytol dans les feuilles, par la technique des traceurs radioactifs.

II. — La biosynthèse du β-carotène et des xanthophylles

La cyclisation

Le précurseur en C_{30} des stéroïdes étant le squalène, il semblerait que son homologue supérieur en C_{40}, le lycopersène, puisse être le précurseur biologique de tous les caroténoïdes. Or, le lycopersène n'a pas été mis en évidence chez les végétaux supérieurs (Mercer, Davies et Goodwin, 1963) et son existence chez *Neurospora crassa* est controversée (Grob, Kirschner et Lynen, 1961 *a* ; Davies, Jones et Goodwin, 1963). Comme par ailleurs, le phytoène est plus largement répandu, ce tétraterpène aliphatique paraît être le précurseur en C_{40} commun à tous les caroténoïdes. Conformément à l'hypothèse de Porter et Lincoln (1950) complétée récemment (Porter et D. G. Anderson, 1962), les caroténoïdes résulteraient de la cyclisation du lycopène, lui-même dérivant du phytoène par des déshydrogénations successives :



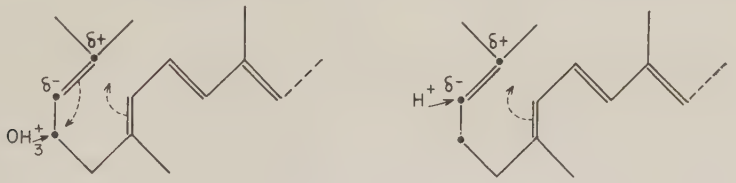
Cette hypothèse n'a encore reçu que des confirmations partielles. C'est ainsi que l'étude des variations de teneurs en polyènes acycliques chez différents mutants de *Rhodospirillum rubrum* et de *Rhodopseudomonas spheroides* étaye l'hypothèse de Porter et Lincoln (Stanier, 1959 ; Jensen et *al.*, 1961). Mais, là encore, la technique des traceurs permet des démonstrations expérimentales plus rigoureuses : ainsi Suzue (1961) a démontré la conversion de phytoène marqué au ^{14}C en δ-carotène par *Staphylococcus aureus*. Avec des plastes isolés du fruit de tomate, Beeler et Porter (1962) ont observé la transformation du phytoène en phytofluène et nous avons montré que les chloroplastes des feuilles de Maïs peuvent utiliser le phytofluène pour synthétiser enzymatiquement le β-carotène, la violaxanthine et la lutéine (Costes, 1963 *a*). Enfin Decker et Ueheleke (1961) ont réalisé pour la première fois la conversion enzymatique du lycopène marqué au ^{14}C en β-carotène avec des chloroplastes de feuilles de Betterave. Ce résultat expérimental a d'ailleurs été confirmé par une technique différente sur la feuille d'Oignon (Godnev et Rotfarb, 1962) la radioactivité du lycopène fourni en solution dans l'huile de Tournesol à des jeunes feuilles d'Oignon étiolées que l'on fait verdir à la lumière, se retrouve dans les carotènes et dans les xanthophylles.

La conclusion est que le lycopène est un précurseur direct des caroténoïdes, mais il n'est probablement pas le seul comme le laissent prévoir les récentes expériences de Beeler et Porter (1963) : à partir d'un mélange de pyrophosphates d'alcools terpéniques marqués au ^{14}C, la radioactivité spécifique du β-carotène isolé des plantes de Tomates est supérieure à celle du lycopène. Ces auteurs suggèrent que le β-carotène puisse résulter de la cyclisation du neurosporène.

L'hydroxylation : biosynthèse des xanthophylles

Nous venons de voir que les étapes qui conduisent au β-carotène ne sont que partiellement connues : par exemple le mécanisme de la cyclisation est complètement inconnu. Dans la biosynthèse des stéroïdes, l'attaque en C_3 du squalène par l'ion hydronium OH_3^+ détermine la cyclisation en lanostérol qui reste hydroxylé en C_3.

Dans le cas des caroténoïdes il semble qu'il n'en soit pas de même : en effet l'attaque protonique sur le 3e carbone du squelette tétraterpénique ne peut théoriquement induire la cyclisation par déplacement des électrons π : c'est une attaque électrophile sur le 2e carbone qui peut provoquer la cyclisation.



Réaction improbable — Réaction probable

Celle-ci ne s'étend pas à l'ensemble de la chaîne en raison de la position *trans* des doubles liaisons $C_{7,8}$ et $C_{7',8'}$ (Olson et Knizley, 1962). Expérimentalement, il a été constaté qu'à partir du lycopène l'hydroxylation peut conduire à des xanthophylles acycliques, la lycoxanthine (3-hydroxy lycopène) et la lycophylle (3,-3' dihydroxy lycopène), chez *Chromatium* (Benedict, Fuller et Bergeron, 1961). De même, chez les bactéries photosynthétiques (*Rhodospirillum rubrum*), où les mécanismes d'hydroxylation et de méthoxylation ont été étudiés en premier, on observe que l'hydroxylation se produit sur des tétraterpènes acycliques, indépendamment de toute cyclisation (Jensen et *al.*, 1958 ; Jensen, 1961).

Dans la série des caroténoïdes, l'hydroxylation n'est donc pas associée à la cyclisation et il semble que les xanthophylles soient synthétisées après les carotènes : les expériences de Claes (1954, 1957, 1958, 1959), réalisées sur le mutant 5/520 de *Chlorella vulgaris* appuient cette hypothèse. Chez ce mutant, cultivé à l'obscurité, seuls les polyènes s'accumulent : à la lumière les pigments normalement rencontrés dans les chloroplastes du type sauvage de *Chlorella vulgaris* sont synthétisés. Si l'éclairement est fourni aux cultures de mutants en anaérobiose, seuls les carotènes apparaissent et les polyènes incolores disparaissent lentement : ce fait est une autre confirmation de l'hypothèse de Porter et Lincoln (1950). Si, après ce traitement, les cultures sont placées à l'obscurité en aérobiose, la teneur en carotènes diminue et les xanthophylles sont très rapidement synthétisées. Claes (1959) en conclut que es carotènes α et β peuvent être les précurseurs immédiats des xanthophylles dans les cellules chlorophylliennes et donne le schéma suivant des faits observés chez le mutant 5/520 de *Chlorella :*

— *Obscurité*	— *lumière* — *anaérobiose*	— *obscurité* — *aérobiose*
Phytoène Phytofluène ζ carotène Prolycopène Protétrahydrolycopène	→ β carotène α carotène	→ xanthophylles

Ces expériences très démonstratives nous semblent cependant avoir une valeur limitée au mutant 5/520. Il est possible que les réactions de transformation constatées chez ce mutant se produisent également dans les cellules vertes du type sauvage.

Mais dans la seconde partie de ce travail nous montrons que d'autres réactions peuvent s'établir entre carotènes et xanthophylles dans les cellules chlorophylliennes (Costes, 1963 *b* ; 1963 *c*) qui ne placent pas obligatoirement les xanthophylles après les carotènes dans la biosynthèse.

L'époxydation : photosynthèse et interconversion entre xanthophylles

De nombreux auteurs ont prêté aux caroténoïdes époxydés un rôle dans le mécanisme de la photooxydation de l'eau dans les feuilles vertes. Aucune preuve décisive n'a été donnée jusqu'à présent de cette intervention des xanthophylles dans la photosynthèse malgré de nombreuses tentatives dont la première est celle de Dorough et Calvin (1951). Fournissant à des Chlorelles de l'eau enrichie en ^{18}O (4 p. 100) ces auteurs déterminent l'enrichissement en ^{18}O des xanthophylles dans deux lots d'algues, l'un à l'obscurité, l'autre à la lumière. Mais le pourcentage d'enrichissement de l'eau est trop faible dans cette expérience pour que la faible accumulation en ^{18}O constatée à la lumière dans les xanthophylles soit considérée comme significative.

Après cette expérience, les seules justifications expérimentales de cette hypothèse ne reposent que sur les dosages des différentes xanthophylles après séparation chromatographique. Ainsi Cholnoky et *al.* (1956) attribuent aux caroténoïdes un rôle dans le transport d'oxygène dans la photosynthèse. Il y aurait un système principal :

$$\text{zéaxanthine} \xrightarrow[(O)]{} \text{anthéraxanthine} \xrightarrow[(O)]{} \text{lutéine}$$

associé à un système secondaire :

$$\beta \text{ carotène} \xrightarrow[(O)]{} \beta \text{ carotène monoépoxyde} \xrightarrow[(O)]{} \alpha \text{ carotène}$$

fonctionnant activement avec le premier système quand la photosynthèse est active. Puis, l'équipe dirigée par Sapozhnikov semble apporter la preuve expérimentale d'une conversion de violaxanthine en lutéine dans les feuilles de *Cyclamen, Polygonum sacchalinense, Vicia Faba, Taraxacum officinale* (Sapozhnikov et *al.*, 1957) et dans les chloroplastes isolés de *Vicia Faba* (Sapozhnikov et Bazhanova, 1958) : la teneur en violaxanthine diminue en même temps que celle en lutéine augmente sous une forte lumière, en anaérobiose ; la réaction inverse se produit à l'obscurité, en aérobiose. Mais nous avons vérifié que dans la technique d'analyse des pigments après chromatographie sur papier utilisée par Sapozhnikov et *al.* (1956), la lutéine et la zéaxanthine ne sont pas séparées : l'interprétation des résultats expérimentaux est donc faussée. Bien que l'interconversion entre violaxanthine et lutéine paraisse étayée par l'expérience de Blass, D. G. Anderson et Calvin (1959) qui ont trouvé la même activité spécifique pour ces deux pigments dans des Chlorelles exposées à $^{14}CO_2$, il ne semble pas que, si elle existe réellement, elle constitue un phénomène important quantitativement. En effet les élégantes expériences de Yamamoto et *al.* (1962 *a*) conduites sur *Spinacea oleracea* et *Phaseolus leunatus* démontrent clairement que lorsque la teneur en violaxanthine diminue dans les feuilles à la lumière, c'est la teneur en zéaxanthine qui augmente, celle de la lutéine ne variant pas. Et ces au-

teurs proposent le schéma suivant de la principale interconversion entre xanthophylles dans les feuilles vertes :

$$\text{violaxanthine} \underset{(O)}{\overset{(O)}{\rightleftharpoons}} \text{anthéraxanthine} \underset{(O)}{\overset{(O)}{\rightleftharpoons}} \text{zéaxanthine}$$

Plusieurs expériences dans la seconde partie du présent travail confirment ce résultat.

Récemment le problème de l'origine de l'oxygène des xanthophylles a été repris avec l'isotope lourd ^{18}O. Avec *Elodea canadensis* et *Chlorella pyrenoidosa* Sapozhnikov et *al.* (1961) montrent, par radioactivation de ^{18}O en ^{18}F radioactif dans la violaxanthine, qu'à la lumière l'oxygène de l'eau est incorporé dans la violaxanthine ; cette incorporation ne se produit pas à l'obscurité. Mais là encore, il n'est pas sûr que la technique utilisée assure une purification suffisante de la violaxanthine. En même temps Yamamoto et *al.* (1962 *b*) mettent en évidence les points suivants chez *Chlorella vulgaris*, avec $^{18}O_2$ et $H_2{}^{18}O$:

— la lutéine, la violaxanthine et la néoxanthine incorporent l'oxygène moléculaire de l'air ;

— la néoxanthine incorpore l'oxygène de l'eau qui n'est pas décelable dans la lutéine ;

— les rendements d'incorporation suggèrent que O_2 se retrouve dans les groupes hydroxyles alors que l'oxygène de H_2O s'intègre dans les groupes époxydes.

Cependant les mêmes auteurs (Yamamoto et *al.*, 1962 *c*) ne réussissent pas à observer l'incorporation de l'oxygène de $H_2{}^{18}O$ dans la violaxanthine et la néoxanthine de chloroplastes d'Épinard pendant la réaction de Hill.

Enfin dans une excellente analyse critique de tous les résultats obtenus dans ce domaine avec ^{18}O, Shneour et Calvin (1962) arrivent à la conclusion que les xanthophylles ne participent pas au transport d'oxygène dans la photosynthèse. Cela n'exclut pas l'existence d'un rôle physiologique des caroténoïdes dans les chloroplastes, voire dans la photosynthèse. Nous discuterons en détail les différentes hypothèses à ce sujet dans notre conclusion : il est cependant intéressant de montrer comment les effets de la température et de l'éclairement sur leur biosynthèse semblent déceler une insertion étroite de ces pigments dans le métabolisme chloroplastique.

L'action du milieu climatique sur la biosynthèse des caroténoïdes foliaires

Action de la lumière.

La lumière est le principal facteur dont l'action a été très étudiée sur la caroténogenèse des feuilles vertes ou étiolées.

Sur les feuilles adultes, les premiers travaux ont montré que l'éclairage avec de la lumière de courte longueur d'onde (436 mμ) diminue la quantité de tous les pigments (carotènes, xanthophylles et chlorophylles) ; la lumière rouge (659 à 667 mμ) favorise la synthèse des chlorophylles et des xanthophylles alors que la lumière verte augmente la masse des carotènes (Whitmore, 1944). Il faut cependant noter que ces résultats, déjà anciens, seraient entièrement à réexaminer par des expériences

où les intensités lumineuses seraient équiénergétiques dans les différentes couleurs. La valeur du flux lumineux est également un important facteur. La biosynthèse du β-carotène (feuilles de Haricot, de Maïs) se fait avec un rendement maximum pour un éclairement optimum voisin de 5 000 lux (Bandurski, 1949, Moster et Quackenbush, 1952 *b*) : nous avons utilisé dans nos expériences un éclairage de cet ordre de grandeur. Si l'éclairement augmente jusqu'à 25 000 lux, la zéaxanthine s'accumule alors que les teneurs en violaxanthine et en β-carotène diminuent (Moster et Quackenbush, 1952 *b*). Chez la Chlorelle, si le flux lumineux atteint 100 000 lux, les cellules se décolorent : l'étude cinétique du phénomène a montré que les carotènes α et β disparaissent les premiers suivis de la chlorophylle *a*, puis ensemble, de la chlorophylle *b* et des xanthophylles (Sironval et Kandler, 1958). La nature des produits de cette destruction photochimique n'est pas connue.

Dans les feuilles de Maïs étiolées, Kay et Phinney (1956 *a* et *b*) ont étudié la cinétique du verdissement à la lumière. Le β-carotène, qui n'existe qu'en faible quantité dans les feuilles étiolées, est le pigment le plus rapidement synthétisé, alors que les teneurs en lutéine et en violaxanthine diminuent légèrement ; parallèlement la chlorophylle *a* apparaît, suivie de la chlorophylle *b*.

Action de la température.

Les effets de la température sur la caroténogenèse sont moins connus. Moster et Quackenbush (1952 *b*) démontrent que si la température s'abaisse jusqu'à + 5°C, la lutéine et la zéaxanthine s'accumulent dans les feuilles alors que la teneur en β-carotène diminue. A partir de ces résultats, les auteurs sont les premiers à émettre l'hypothèse d'une transformation enzymatique :

zéaxanthine ——→ β-carotène

hypothèse à laquelle nous donnons un support expérimental dans ce travail (Costes, 1963 *b* et *c*) et que nous discuterons dans notre conclusion.

De même chez une algue unicellulaire verte, *Haematococcus pluvialis*, le froid ($t = + 4$°C) provoque la disparition du β-carotène et permet l'accumulation d'une xanthophylle de structure β, l'astaxanthine (Saccone, 1959).

Nous avons déjà rapporté les principaux travaux qui ont établi les variations parallèles des teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes sous l'action des facteurs climatiques. Lors du jaunissement des feuilles, en automne, il a été clairement montré que le β-carotène disparaît très rapidement et que les xanthophylles sont estérifiées (Goodwin, 1958, Eichenberger et Grob, 1962 *a* et *b*).

C. Conclusions de l'étude bibliographique : les objectifs du travail expérimental

Au terme de l'analyse des travaux qui ont porté sur le métabolisme des caroténoïdes foliaires, nous voyons se dégager de nombreux problèmes sans solution.

D'une part, comme nous l'avons exprimé, les caroténoïdes et les chlorophylles sont toujours associés, dans les structures, à un instant donné, et au cours de l'évolution de ces structures. Ce parallélisme implique au moins un chaînon commun dans la

biosynthèse, probablement au niveau du phytol des chlorophylles. Dans ce travail nous avons essayé d'établir expérimentalement ce point, encore hypothétique.

D'autre part, cette étude fait ressortir le caractère particulier du β-carotène parmi tous les pigments chloroplastiques. En effet le β-carotène présente plusieurs particularités sur les plans suivants :

1. *répartition et structure* : le principal hydrocarbure alicyclique est de structure β alors que la plus importante des xanthophylles est de structure α.

2. *biosynthèse* : il semble que ce pigment soit le plus rapidement synthétisé dans les chloroplastes. Ce point établi avec du $^{14}CO_2$ reste à confirmer avec des techniques valables. A ce sujet, il faut signaler qu'aucune des études de biosynthèse à partir de l'acétate ou du mévalonate n'avait porté sur les xanthophylles jusqu'au présent travail.

3. *destruction* in vivo : ce pigment qui est toujours synthétisé le premier est également celui qui disparaît le plus vite dans certaines conditions d'éclairement intense ou de vieillissement des structures.

Ce corps, qui a le même squelette carboné que les xanthophylles, a un comportement entièrement différent de celui des autres pigments dans les cellules chlorophylliennes. Les études faites jusqu'à ce jour sur la biosynthèse de ces substances ne permettent pas d'expliquer cette originalité. Les expériences que nous allons décrire maintenant doivent être considérées comme un ensemble conduisant à une tentative d'explication.

CHAPITRE II

LES MÉTHODES ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

A. Matériel végétal

I. — Choix du matériel

L'ensemble de ce travail a été réalisé sur des feuilles de Tomate et de Maïs. Nous avons choisi la Tomate car c'est un végétal autogame, qui a des feuilles pétiolées et de rangs facilement repérables. Ces caractères permettent de prélever des feuilles de même âge dans un lot de plantes génétiquement homogène : l'échantillonnage est donc facilité. Par ailleurs le développement rapide de cette plante permet de répéter de nombreuses expériences. Nous avons utilisé le Maïs à cause de sa graine assez grosse pour nourrir des plantules étiolées bien développées.

II. — Variétés et types de culture

Tomate.

La variété de *Lycopersicum esculentum* L. est la *Marmande.* Les graines sont semées sur terreau et repiquées 2 fois : 15 jours et ensuite 1 mois après le semis, sur

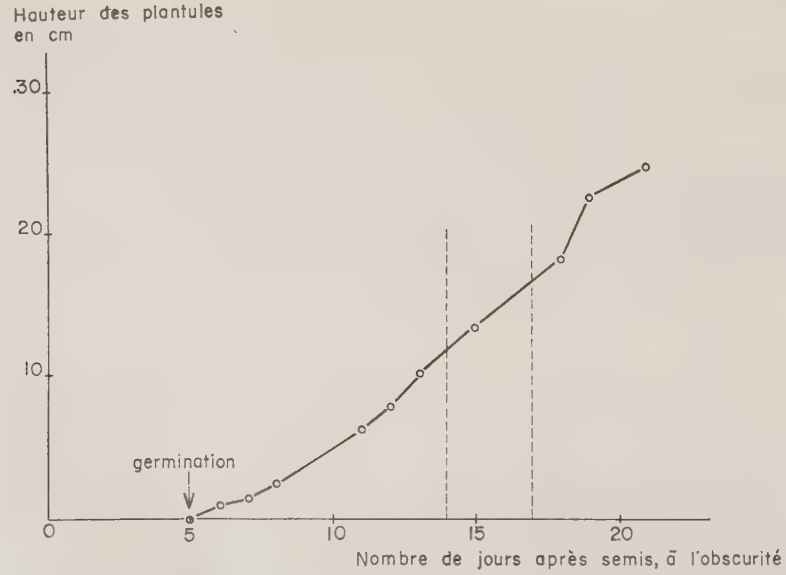


Fig. 1. — *Courbe de croissance des plantules de Maïs, à l'obscurité, après semis sur vermiculite* (entre les pointillés, période de prélèvement de feuilles pour les expériences)

un mélange de terre de bruyère et de sable. Pour les expériences les feuilles sont prélevées 2 à 3 mois après le dernier repiquage. Pendant cette période les feuilles ont une teneur en matière sèche de 10 p. 100 pour les plus jeunes à 25 p. 100 pour les plus âgées.

Maïs.

Plante allogame, *Zea mays* L. ne connaît pas de variétés fixées. Nous avons utilisé des graines d'hybrides : hybride double FV 115 × W 33 et hybride simple HS 114, ainsi que INRA 200.

Les graines sont semées sur vermiculite après avoir trempé dans l'eau bipermutée pendant 1 journée. Puis elles sont placées à l'obscurité et arrosées tous les deux jours avec de l'eau. La courbe de croissance en fonction du temps, établie pour 15 plantes (fig. 1) nous a incité à utiliser les feuilles étiolées 14 à 17 jours après le semis. Leur teneur en matière sèche est alors de 8 à 10 p. 100.

B. Techniques chimiques d'analyse et de purification

Les chlorophylles et les caroténoïdes dont les molécules renferment un système de doubles liaisons conjuguées, sont fragiles et se dégradent facilement sous l'action des facteurs suivants :

température supérieure à 40°-50°C.
milieux acides.
oxydation.
lumière intense.

Les méthodes d'extraction et de dosage doivent tenir compte de cette fragilité : il faut une fixation rapide, le moins possible de manipulations et en chromatographie, des adsorbants doux. Il faut toujours travailler en lumière atténuée.

I. — Extraction des pigments chloroplastiques

On pèse 0,2 à 0,7 g de limbe foliaire. On fixe dans l'azote liquide et on broie immédiatement dans de l'acétone refroidie, dans un mortier, en présence de sable et de carbonate de calcium afin de neutraliser l'acidité du broyat. On pratique une extraction par l'acétone jusqu'à décoloration complète de la pulpe. Il faut environ 100 ml d'acétone par g de feuille fraîche. L'extrait acétonique est filtré sur verre fritté n° 4 ou sur papier-filtre délipidé, et amené à 100 ml en ajoutant de l'eau de façon que la solution finale contienne 80 p. 100 d'acétone (solution I).

II. — Les chlorophylles et le phytol

Dosage des chlorophylles

Les chlorophylles sont dosées dans la solution I par la méthode de Mackinney (1941). Après une dilution de 1/5 à 1/10, on mesure, dans des cuves de 1 cm d'épaisseur, par rapport à un blanc acétone/eau : 80/20, les densités optiques de la solution I

aux longueurs d'ondes suivantes : 663 mμ, 645 mμ, et 652 mμ. Dans la solution étudiée, les teneurs en chlorophylle, exprimées en mg par litre, se calculent à l'aide des formules suivantes :

$$\text{chlorophylle } a = 12{,}7\ D_{663} - 2{,}69\ D_{645}$$
$$\text{chlorophylle } b = 22{,}9\ D_{645} - 4{,}68\ D_{663}$$

La chlorophylle totale est calculée d'après la formule de BRUINSMA (1961-1963)

$$\text{chlorophylle totale} = \frac{1\,000\ D_{652}}{36} \text{ en mg par litre}$$

Les résultats sont reproductibles à 10 p. 100 près et un dosage après séparation chromatographique ne permet pas d'avoir une meilleure précision, la chlorophylle *b* se dégradant très rapidement sur les colonnes.

Séparation des chlorophylles a *et* b *par chromatographie sur cellulose*

Lorsque nous faisons des comptages de radioactivité sur des pigments purifiés, les chlorophylles *a* et *b* sont séparées d'après la technique de DURANTON, GALMICHE et ROUX (1958) modifiée par LABORIE (1963).

On prend 50 ml de la solution hydro-acétonique I que l'on traite 3 fois par 15 ml d'éther de pétrole (t = 40-60°C). L'épiphase éthéro-pétrolique (solution II) est lavée soigneusement avec de l'eau permutée pour retirer l'acétone. Afin d'éliminer la néoxanthine et la violaxanthine qui peuvent interférer avec la chlorophylle *b* pendant la chromatographie, cette solution éthéropétrolique est agitée avec 3 fois 15 ml du mélange méthanol/eau : 80/20 en volume. La néoxanthine, la violaxanthine et une partie de la lutéine et de la chlorophylle *b* sont hypophasiques. L'épiphase contient le β-carotène, une partie de la lutéine, la chlorophylle *a*, la phéophytine *a* la plus grande partie de la chlorophylle *b* et de la phéophytine *b*. Le méthanol est entraîné par un lavage à l'eau permutée et la solution éthéropétrolique est séchée sur Na_2SO_4 (solution III).

Cette solution est chromatographiée sur une colonne (100 × 17 mm) contenant 8 g de cellulose (*Whatman, Standard Grade*). Les pigments sont élués dans l'ordre suivant :

— éther de pétrole ⟶ β-carotène repris dans 25 ml d'éther de pétrole ;
— éther de pétrole + 4 p. 100 acétone ⟶ lutéine + phéophytine *a* ;
— éther de pétrole + 6 p. 100 acétone ⟶ chlorophylle *a* reprise dans 10 ml d'éthanol ;
— éther de pétrole + 8 p. 100 acétone ⟶ chlorophylle *b* reprise dans 5 ml d'éthanol.

Les chlorophylles *a* et *b* sont identifiées par leur spectre dans l'éther éthylique et dans l'éthanol (fig. 2 et 3) La pureté de la chlorophylle *a* obtenue par cette méthode peut être estimée par son spectre infrarouge (fig. 4) : une solution de chlorophylle *a* dans l'éther de pétrole est adsorbée sur 300 mg de KBr. L'éther de pétrole est évaporé sous vide et le spectre de la pastille KBr + chlorophylle *a* est tracé au spectrophotomètre Beckman IR 7 : les bandes de ce spectre coïncident avec celles données par WEIGL et LIVINGSTON (1953) et STOLL et WIEDEMANN (1959).

Afin de déterminer les activités spécifiques, les densités optiques des solutions éthanoliques des chlorophylles *a* et *b* sont immédiatement mesurées après la chromatographie à :

650 mμ pour la chlorophylle *b* $E_{1\ cm}^{1\ \%} = 397$

665 mμ pour la chlorophylle *a* $E_{1\ cm}^{1\ \%} = 817$

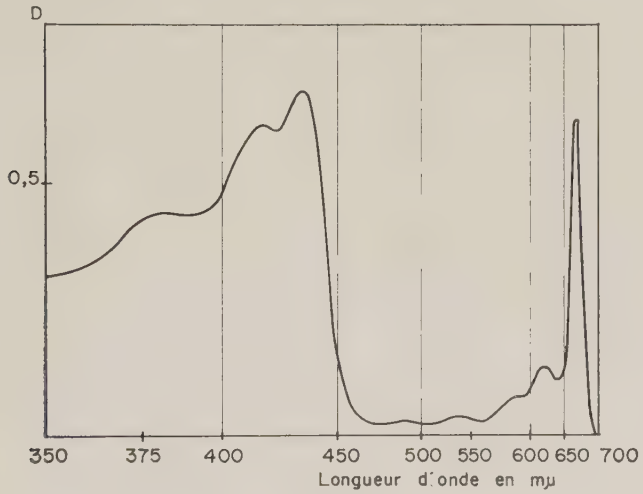


Fig. 2. — *Spectre d'absorption de la chlorophylle* a *en solution dans l'éthanol*

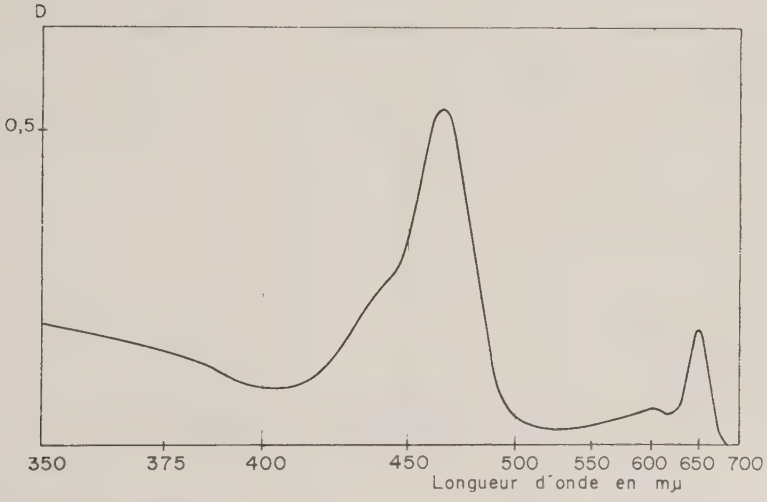


Fig. 3. — *Spectre d'absorption de la chlorophylle* b *en solution dans l'éthanol*

Les coefficients d'extinction $E_{1\ cm}^{1\ \%}$ ont été calculés d'après les spectres publiés par Sprecher von Bernegg et *al.* (1935).

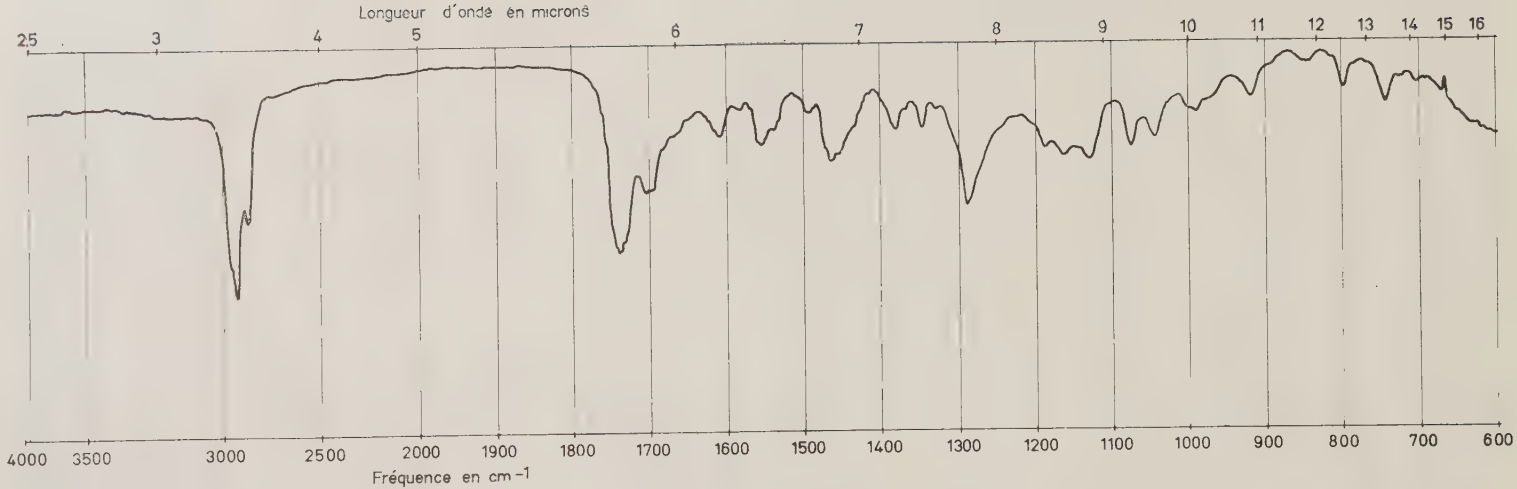


FIG. 4. — *Spectre infrarouge de la chlorophylle* a (environ 1 p. 1000 dans une pastille de 300 mg de KBr)

Chromatographie des chlorophylles
sur papier et sur chromatoplaques d'acide silicique

Dans certaines expériences nous avons fait des autoradiochromatogrammes. Les pigments chloroplastiques se séparent bien sur papier Whatman n° 1 imprégné de $CaCO_3$ selon la technique de ANGAPIDU et *al.* (1958) ou sur papier Whatman n° 3. Nous utilisons des feuilles de 23 × 23 cm et nous développons en chromatographie ascendante avec les solvants suivants :

1re dimension	éther de pétrole (40-60°C)	98
	n propanol	2
2e dimension	éther de pétrole (40-60°C)	85
	acétone	10
	benzène	5

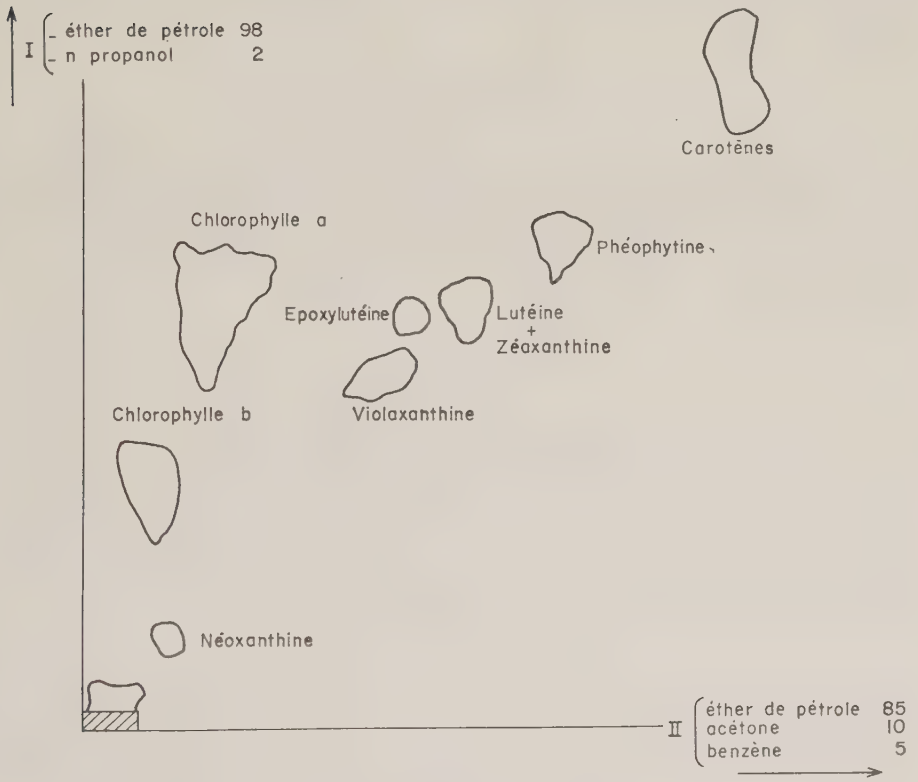


FIG. 5. — *Schéma de la séparation des pigments chloroplastiques par chromatographie sur papier à deux dimensions*
(papier Wahtman n° 1 ou n° 3)

Nous mettons un volume de solution correspondant à 5 à 10 mg de feuille sur la tache de départ (solution I ou II), en séchant sous un courant d'azote. Sur le chromatogramme les pigments se répartissent comme il est indiqué sur la figure 5 et sur la figure 35.

Sur chromatoplaques d'acide silicique préparées selon la technique de Demole (1958), les pigments se séparent à partir de la solution II éthéropétrolique en développant avec le solvant :

hexane	70 p. 100
acétate d'éthyle	30 p. 100

Saponification des chlorophylles a *et* b *et extraction du phytol*

Les solutions de chlorophylle *a* et de chlorophylle *b* dans l'éthanol sont saponifiées par 2 ml de KOH à 15 p. 100, au réfrigérateur (3°C) pendant une nuit. Le phytol est extrait du mélange réactionnel par 3 fois 5 ml d'éther de pétrole. La solution éthéropétrolique est lavée par 100 ml d'eau ce qui élimine l'éthanol en excès, et aussi le méthanol libéré lors de sa saponification. La solution de phytol est ajustée à 10 ml. Le phytol a été caractérisé par comparaison avec un échantillon de phytol light par chromatographie sur chromatoplaques d'acide silicique selon Demole et Lederer (1958).

III. — Les caroténoïdes foliaires

Un premier travail que nous avions réalisé sur les effets de la nutrition azotée sur les pigments de la feuille de Tabac (Costes et Coïc, 1957) avait attiré notre attention sur la difficulté de séparer quantitativement les xanthophylles par les méthodes classiques. Nous avons donc mis au point une technique de dosage des caroténoïdes foliaires après chromatographie sur cellulose (Costes, 1958, 1963 *b*).

Séparation des caroténoïdes par chromatographie sur cellulose

Dans beaucoup de travaux, les auteurs s'attachent à séparer sur une même colonne les chlorophylles et les caroténoïdes. Les adsorbants choisis sont alors l'hydroxyde de calcium (Moster et *al.*, 1952 *a* ; Bickoff et Livingston, 1954), le saccharose (Strain, 1948) ou la cellulose (Hager, 1957 *b* ; Duranton, Galmiche et Roux, 1958). Or avec ces deux derniers adsorbants nous avons vérifié qu'il est souvent difficile de séparer la phéophytine *a* et la lutéine. Lors du développement du chromatogramme l'interférence des deux anneaux n'est visible qu'en examinant la colonne avec une lampe à lumière ultraviolette (366 mμ) : l'anneau de phéophytine émet une fluorescence rouge qui recouvre l'anneau de lutéine. Après l'élution, la solution de lutéine émet elle-même une fluorescence rouge en UV, témoignant ainsi du mélange des deux pigments. Au cours du dosage cela se traduit par une erreur par excès dans la teneur en lutéine. Dans les travaux réalisés avec ces techniques en utilisant des précurseurs marqués au ^{14}C (Roux et Husson, 1952 *a* et *b* ; Shlyk et Godnev, 1958 ; Billot et Leroy, 1960), les activités spécifiques sont surestimées à cause de la contamination due à la phéophytine. D'autre part, s'il existe des esters de xanthophylle dans les extraits, ils ne sont pas adsorbés sur le saccharose et sur la cellulose et sortent des colonnes avec les carotènes. Ces faits nous ont incité à faire une chromatographie des caroténoïdes après élimination des substances tétrapyrroliques et des esters de xanthophylles éventuels, par saponification.

L'extrait acétonique I (50 ml) est traité par 10 ml de potasse aqueuse à 15 p. 100.

On laisse la saponification se faire pendant environ 12 heures, à l'obscurité, à 3°C dans un réfrigérateur. Le mélange réactionnel est alors traité par l'éther de pétrole (4 fois 20 ml), lavé avec de l'eau permutée et séché sur sulfate de sodium anhydre. Une évaporation rapide au ballon tournant, à froid, permet de reprendre les caroténoïdes quantitativement, d'abord par l'éther de pétrole, ensuite par 2 fois 0,5 ml d'acétone. Ainsi la solution finale, ajustée à 50 ml avec de l'éther de pétrole, ne contient pas plus de 2 p. 100 d'acétone (solution IV).

Sur une colonne de 100 × 13 mm contenant 6 g de poudre de cellulose (WHATMAN STANDARD GRADE), préalablement lavée par 30 ml d'éther de pétrole (E = 40-60°C), on verse 10 à 30 ml de la solution IV. L'élution se fait progressivement, mais par paliers, le pourcentage d'acétone dans l'éther de pétrole augmentant d'une façon discontinue.

Le β-carotène est élué par de l'éther de pétrole (fraction A). Le carotène α est élué en même temps, mais il n'existe pas dans nos extraits foliaires de Tomate et de Maïs.

La lutéine et la zéaxanthine sont éluées (fraction B) par un mélange

éther de pétrole	97 p. 100
acétone	3 p. 100 (en volume)

Dans la plupart des expériences la zéaxanthine est absente. Mais quand on la rencontre, elle sort de la colonne après la lutéine sans être correctement séparée.

L'époxylutéine (fraction B') est éluée avec le mélange

éther de pétrole	96 p. 100
acétone	4 p. 100

La violaxanthine suivie de son isomère l'auroxanthine et de la flavoxanthine sont éluées (fraction C) par :

éther de pétrole	93 p. 100
acétone	7 p. 100

La flavoxanthine peut être séparée de la violaxanthine avec 6 p. 100 d'acétone dans l'éther de pétrole.

Enfin, la néoxanthine (fraction D) est éluée par :

éther de pétrole	90 p. 100
acétone	10 p. 100

Comme le saccharose, la cellulose n'adsorbe pas les hydrocarbures mais retient les xanthophylles avec des énergies d'autant plus grandes qu'elles possèdent plus d'hydroxyles, celles contenant en plus un ou plusieurs ponts époxydes étant les plus adsorbées.

Dosage des caroténoïdes

Le β-carotène est recueilli dans 25 ml ou 50 ml d'éther de pétrole, et dosé par mesure de la densité optique à 449 mμ en prenant comme coefficient d'extinction $E^{1\%}_{1cm} = 2\,560$ (moyenne des coefficients rapportés par GOODWIN, 1955). Pour les xanthophylles nous avons mis au point un dispositif automatique de dosage par

spectrophotométrie (fig. 6). Après la sortie du β-carotène, le liquide d'élution peut être fractionné par un siphon (*a*) en volumes égaux de 1,8 ml. Chaque contenu du siphon tombe dans une cuve cylindrique en verre (*b*) de 0,7 cm de diamètre intérieur au dessous duquel est soudé un capillaire (*c*). Freiné par le capillaire, chaque volume siphoné s'écoule lentement (1 minute environ) dans des tubes (*d*) portés par une

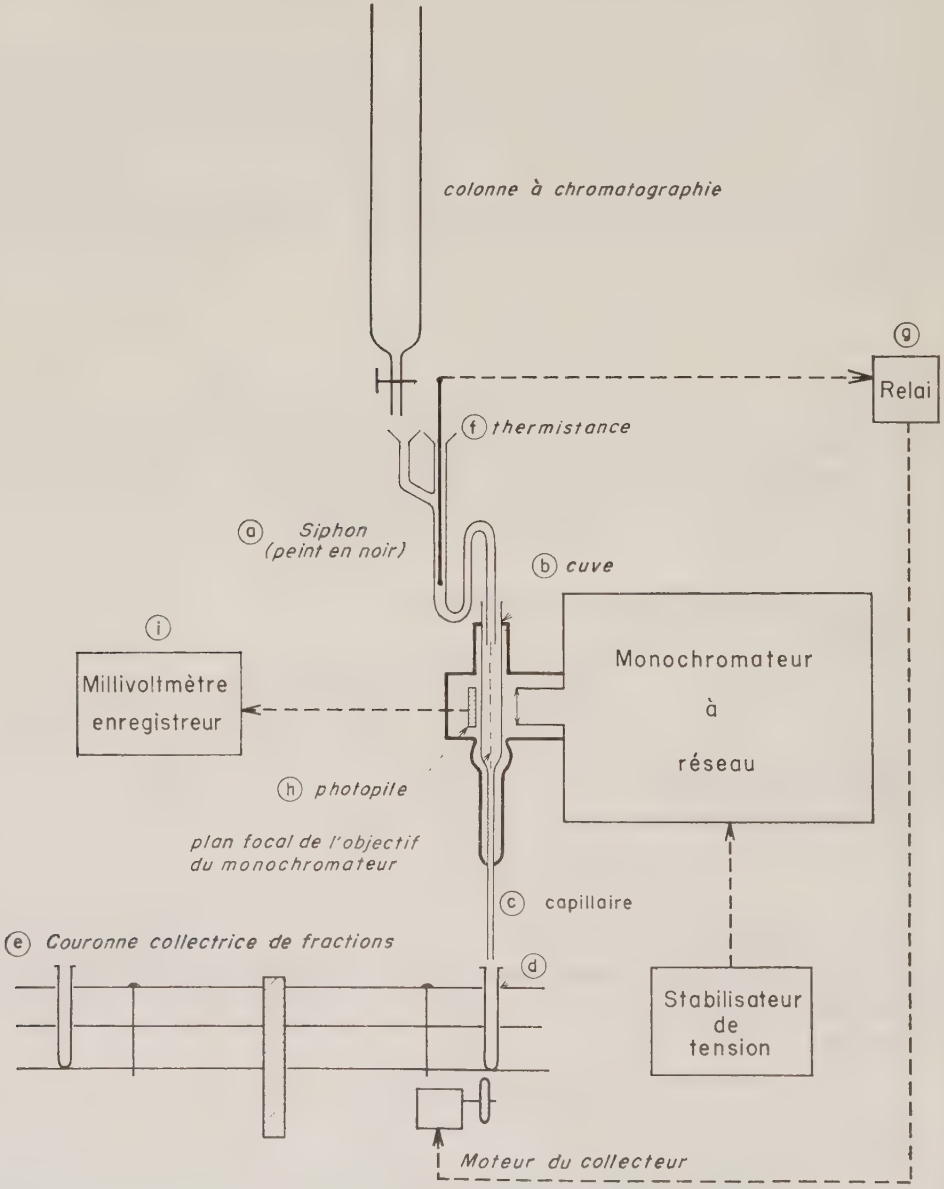
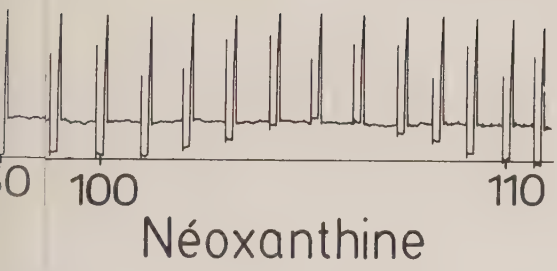


FIG. 6. — *Schéma du dispositif permettant l'analyse automatique d'un mélange de caroténoïdes par spectrophotométrie enregistrée*
(Les lettres du schéma renvoient au texte)


0
100
110
Néoxanthine

Séparation des xanthophylles par chromatographie sur colonne de cellulose

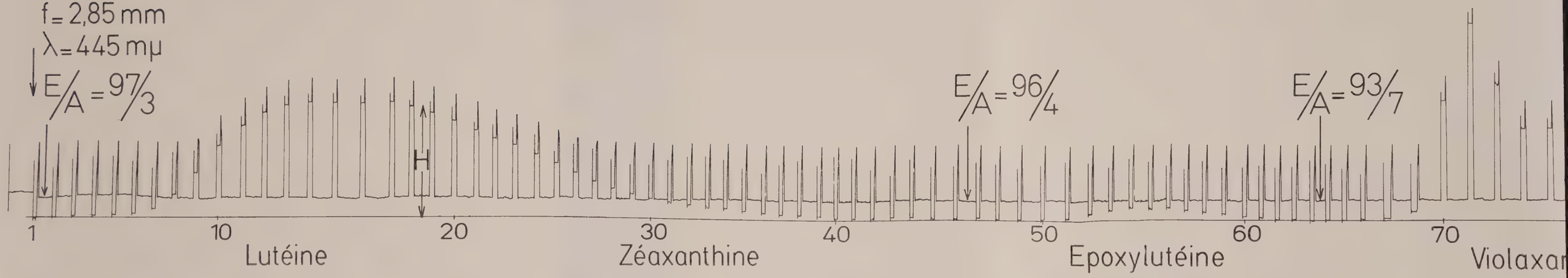
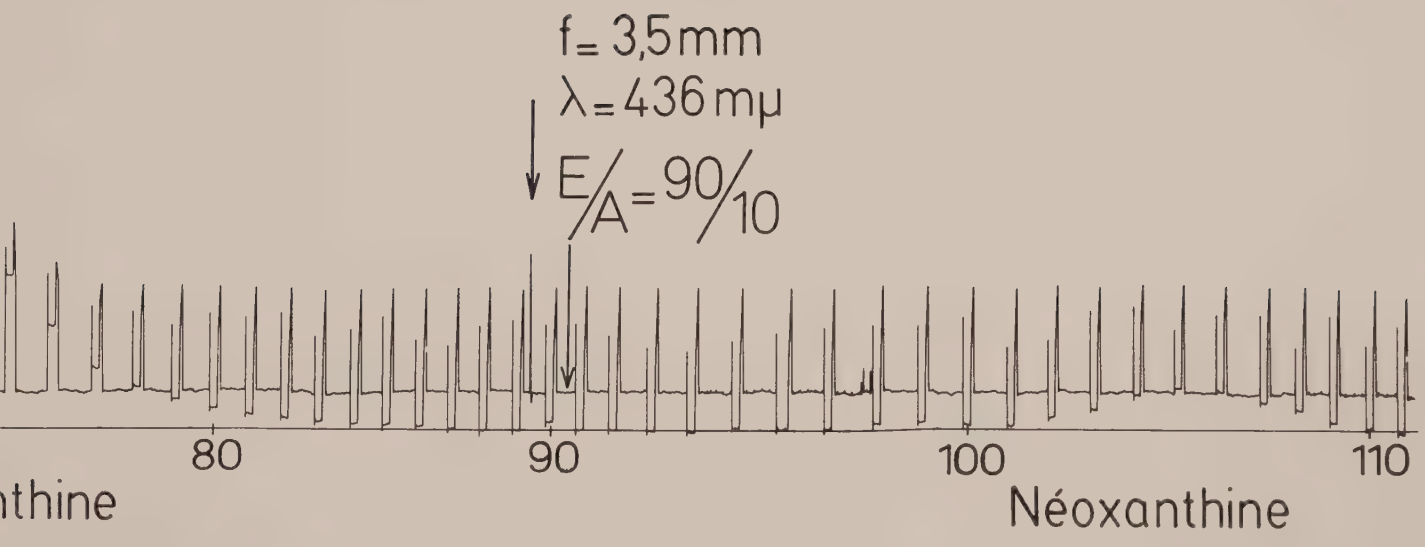


FIG. 7. — *Enregistrement du chromatogramme liquide montrant la séparation des xanthophylles à la sortie d'une colonne de cellulose* En abscisses : numéro des tubes du collecteur de fraction. En ordonnées :



éflections H du millivoltmètre enregistreur

couronne collectrice circulaire (*e*) (1). Le mouvement de cette couronne est commandé par une thermistance (*f*) plongeant dans le siphon et agissant sur un relai électronique (*g*). La cuve cylindrique (*b*) est intercalée entre l'objectif d'un monochromateur dont la source lumineuse est stabilisée et une photopile (*h*). Pour la lutéine, l'époxy-lutéine et la violaxanthine, le monochromateur est réglé sur 445 mμ et pour la néo-xanthine sur 436 mμ. Le plan focal du monochromateur contient l'axe de la cuve cylindrique (*b*) : dans ces conditions la lumière qui traverse le liquide d'élution est parfaitement homogène pour une largeur de bande de 10 mμ. L'éluat siphoné descen-

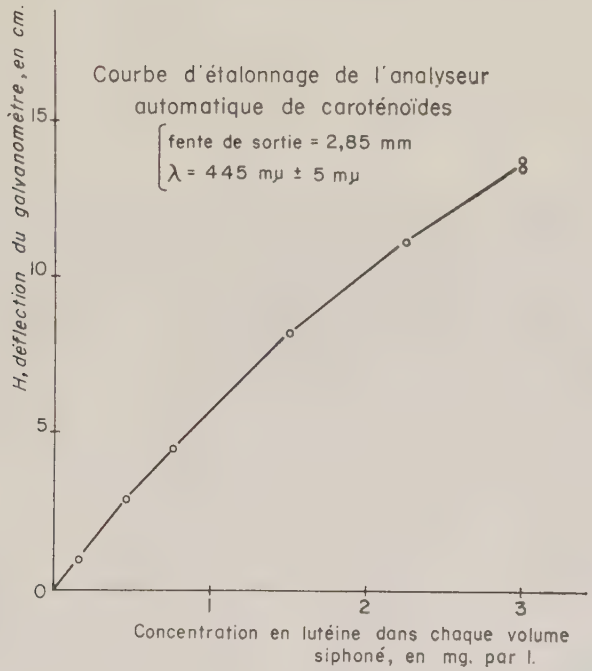


FIG. 8. — *Courbe d'étalonnage de l'analyseur automatique des caroténoïdes : variations de H en fonction de la concentration en lutéine dans l'éluat*

dant lentement dans la cuve (*b*), la lumière, transmise par la solution de pigment frappe la photopile (*h*) aux bornes de laquelle apparaît une force électromotrice. Cette force électromotrice est enregistrée pour chaque siphonage par un millivoltmètre enregistreur SEFRAM (*i*). On obtient ainsi un enregistrement du chromatogramme liquide qui permet dans chaque cas d'apprécier l'acuité de la séparation chromatographique (fig. 7 et 9).

Dans le travail de série, nous avons utilisé ces enregistrements pour doser chacun des pigments. On trace la courbe d'étalonnage de H en fonction de la concentration en lutéine dans chaque volume siphoné (fig. 8), H étant la différence entre la ligne de référence correspondant au solvant pur dans le tube et la déflection du millivoltmètre pour une concentration connue de lutéine dans le liquide d'élution (fig. 7). Il suffit alors de rapporter la courbe d'étalonnage à l'enregistrement pour

(1) Collecteur de fractions conçu et réalisé par Mr LESAINT.

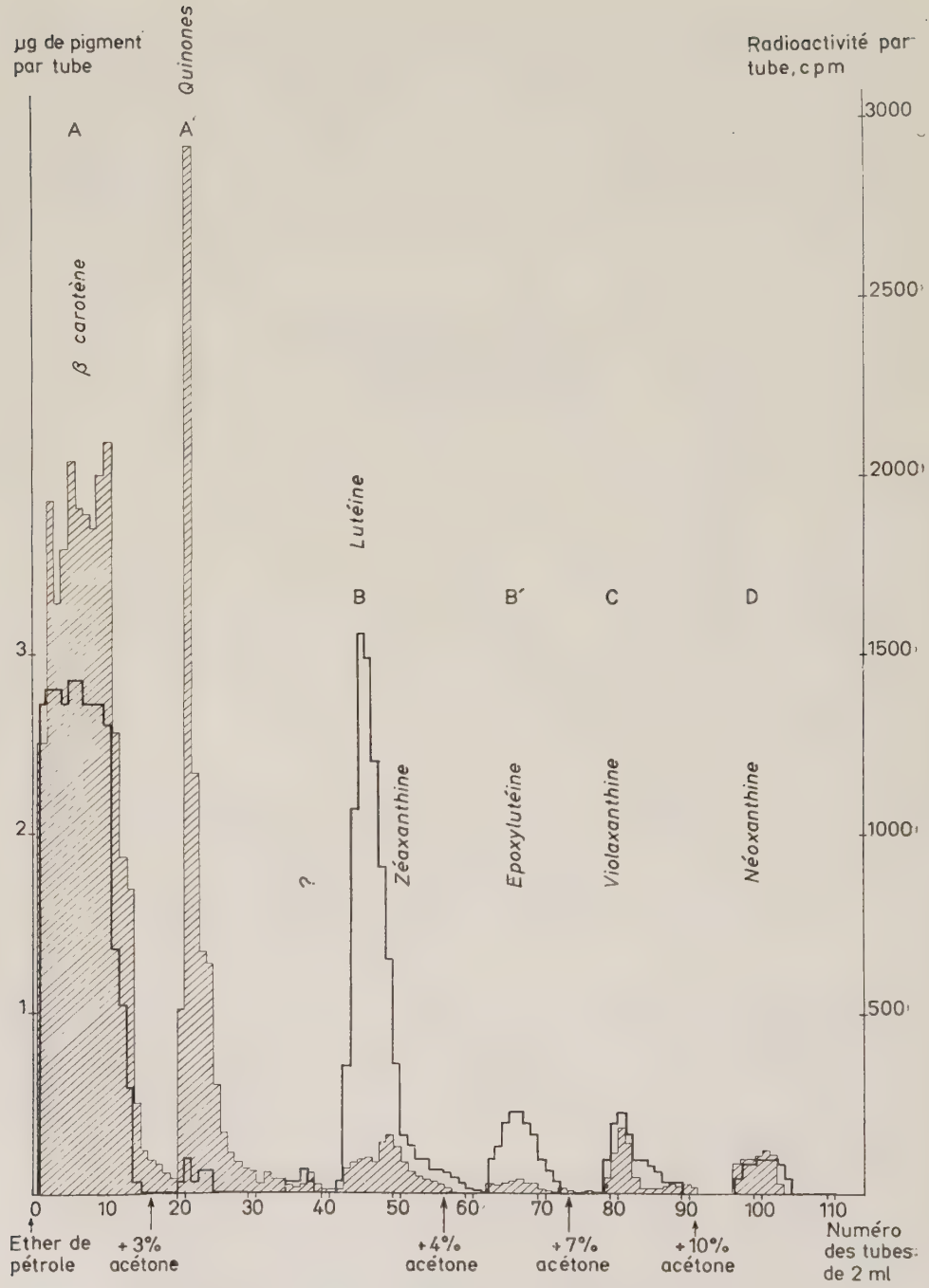


FIG. 9. — *Diagrammes montrant la séparation, par chromatographie sur cellulose, des caroténoïdes marqués à partir de $^{14}CO_2$, dans la feuille de Tomate*

Trait épais : teneurs en pigment dans chaque tube, exprimée en µg de β-carotène.
Trait fin (parties hachurées) : radioactivité totale dans chaque tube, en coups par minute.

connaître la concentration x_i en mg/l dans chaque tube. Pour un pic la quantité de pigment éluée est alors :

$$\frac{\Sigma x_i \times 1{,}8}{1\,000}, \text{ exprimée en mg de lutéine.}$$

Une série d'essais portant sur la même solution de caroténoïdes n'a donné aucun écart supérieur à 3 p. 100 sur le Σx_i de chaque pigment. La méthode se montre donc très reproductible.

L'intérêt de cette technique est de permettre le dosage de faibles quantités de pigment, difficilement visible à l'œil sur les colonnes. De plus il est possible, en vue des comptages de radioactivité de prélever le contenu de tubes correspondant au début, au milieu ou à la fin d'un pic. C'est ainsi que nous avons pu séparer la lutéine de la zéaxanthine avant de les rechromatographier pour les purifier.

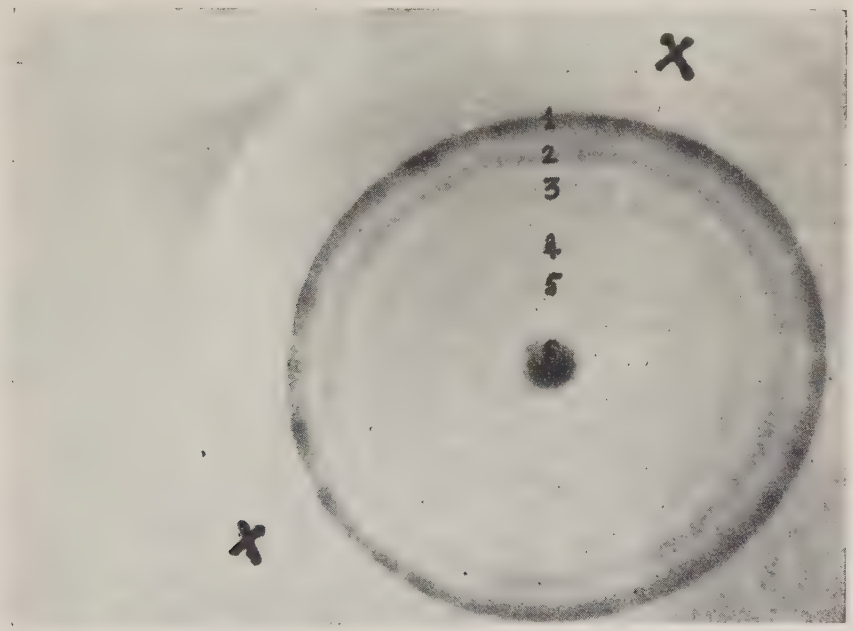


Fig. 10. — *Autoradiogramme d'une chromatographie circulaire de l'insaponifiable de feuilles de Tomate sur papier Schleicher et Schull n° 287*

(Photosynthèse en présence de $^{14}CO_2$)

1 : Fraction A contenant le β carotène.
2 : Fraction A′ : substances quinoniques altérées après la saponification.
3 : Lutéine et zéaxanthine.
4 : Violaxanthine.
5 : Néoxanthine.
6 : Tache initiale.

Chromatographie sur papier et sur chromatoplaques

Comme pour les chlorophylles nous avons parfois procédé à des séparations de caroténoïdes sur papier, à partir de la solution éthéropétrolique IV.

Suivant la technique de A. Jensen et S. L. Jensen (1959) nous avons fait des

chromatographies circulaires sur papier Schleicher et Schull n° 287 (chargé de 20 p 100 de Kieselgur) en mettant au centre du papier 0,5 ml de la solution IV correspondant à 7 mg de feuille. Les pigments se séparent comme il est indiqué sur la figure 10 en utilisant comme solvant :

{ hexane 98,5
{ isopropanol 1,5 en volume

Sur chromatoplaques d'acide silicique préparées d'après la technique de DEMOLE (1958), on obtient une bonne séparation des caroténoïdes avec le solvant :

{ hexane 90
{ éther éthylique 10 (voir fig. 11)

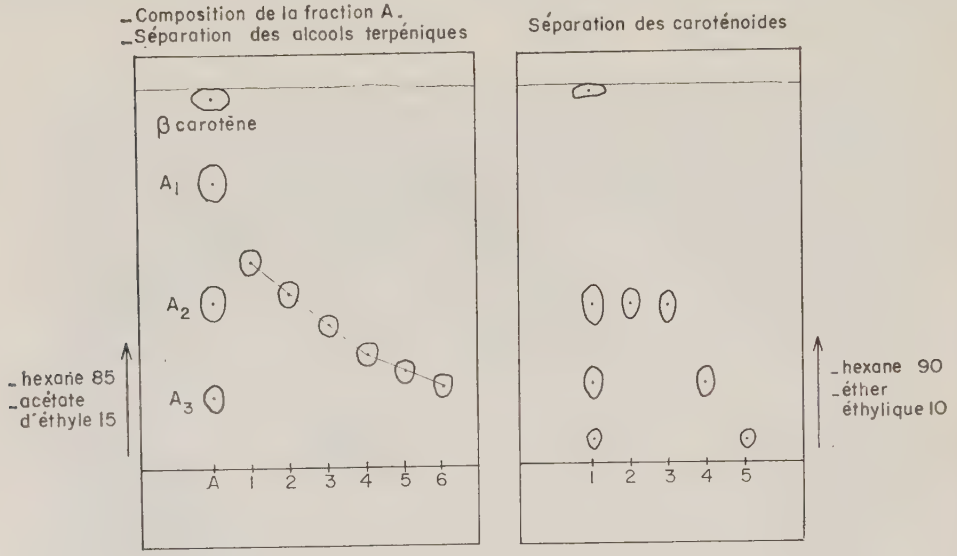


FIG. 11. — *Schémas montrant la séparation des composants de la fraction A, des alcools terpéniques, et des caroténoïdes, par microchromatographie sur acide silicique*

A : fraction A (feuilles de Tomate)
1 : isophytol
2 : géranyllinalool
3 : phytol
4 : géranylgéraniol
5 : farnésol
6 : géraniol

1 : insaponifiable extrait de feuilles de Tomate
2 : lutéine
3 : époxylutéine (B')
4 : violaxanthine
5 : néoxanthine

La révélation de ces chromatoplaques avec du permanganate de potassium en solution aqueuse à 2,5 p. 1 000 nous a montré que la fraction de tête éluée par l'éther de pétrole de nos colonnes de cellulose contenait des impuretés incolores mélangées au β-carotène.

Purification des caroténoïdes séparées sur cellulose

Dans le but de procéder à des comptages de radioactivité sur des pigments purs, nous avons cherché à connaître la composition des fractions éluées à partir de la cellulose. Nous avons nommé ces fractions A, A', B, B', C et D.

Fraction A.

Composition de la fraction A. — Éluée par l'éther de pétrole, cette fraction contient le β-carotène mais aussi 3 impuretés complexes. L'hétérogénéité de la fraction A apparaît en chromatographiant cette fraction sur chromatoplaques d'acide silicique en développant avec le solvant hexane/acétate d'éthyle 85/15 en volume. En plus de la tache du β-carotène qui se déplace avec le front du solvant, 3 taches sont révélées par le permanganate de potassium : A_1, A_2 et A_3 (fig. 11). Le tableau 4 résume les caractéristiques de ces taches sur chromatoplaques.

TABLEAU 4

Réactions des composants de la fraction A

Tache	Rf	Action de $KMnO_4$	Action de $SbCl_3$	Fluorescence en UV à 366 m μ	Absorption en UV à 253,7 μ
A_1	0,75	+	—	—	++
A_2	0,43-0,44	++	+	—	+
A_3	0,18	++	—	—	++

Afin de préciser la nature de ces composants de la fraction A, nous avons traité 240 g de feuilles de Tomate par de l'acétone. Après saponification, la solution éthéropétrolique est chromatographiée sur 6 colonnes contenant chacune 85 g de cellulose (250 × 30 mm). La fraction A est éluée par l'éther de pétrole, la fraction A' par le mélange éther de pétrole/acétone : 97/3 et les xanthophylles par de l'acétone pure.

La fraction A contient 1,26 g de matière sèche et le dosage spectrophotométrique du β-carotène indique 27,7 mg. Ces deux chiffres permettent de mesurer l'importance des impuretés qui voisinent avec le β-carotène.

La fraction A est alors soumise à une chromatographie sur une colonne de 50 g d'acide silicique Mallinckrodt (180 × 28 mm) et développée avec du benzène. L'éluat est fractionné en volumes de 20 ml et l'examen du contenu des fractions obtenues nous montre que :

— les taches A_1, A_2 et A_3 sont chacune formées de plusieurs constituants ;

— l'un des constituants de la tache A_2 est le phytol, identifié par sa réaction positive avec le trichlorure d'antimoine et par chromatographie avec du phytol pur. Ce phytol provient de la saponification des chlorophylles ;

— les autres impuretés semblent être constituées de cires, de stérols, de produits dérivés des quinones, mais nous n'avons pas poussé plus loin les caractérisations.

Le β-carotène élué le premier de la colonne d'acide silicique par le benzène est pur. En effet, il n'apparait aucune tache révélable par $KMnO_4$, $SbCl_3$ ou en lumière ultraviolette sur les chromatoplaques développées soit avec de l'hexane contenant 15 p. 100 d'acétate d'éthyle soit avec de l'hexane pur. Dans ces deux systèmes de solvants le β-carotène extrait cochromatographié avec du β-carotène synthétique Hoffman-Laroche ne donne qu'une seule tache. Enfin les spectres d'absorption

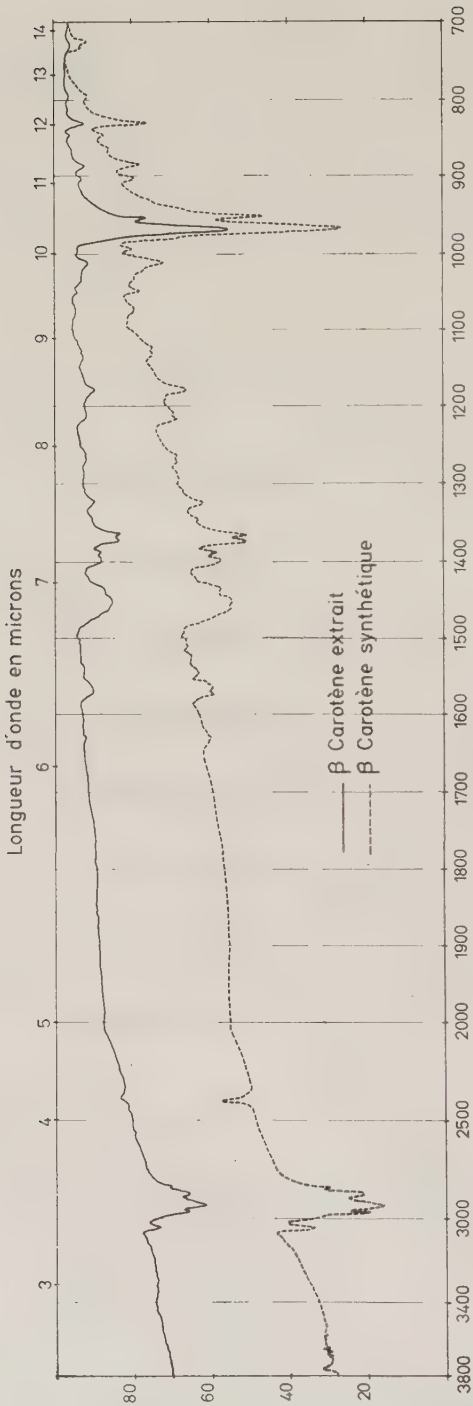


FIG. 12. — *Spectre infrarouge du β-carotène purifié par chromatographie sur colonne d'alumine* (environ 1 p. 1 000 dans une pastille de 300 mg de KBr)

dans le visible et l'UV sont identiques à ceux du β-carotène synthétique. Il en est de même des spectres infrarouges réalisés avec la technique décrite pour la chlorophylle *a* (fig. 12).

Purification du β-carotène par chromatographie sur alumine. — Nous avons essayé de purifier le β-carotène de la fraction A avec d'autres adsorbants.

Sur colonne de magnésie + Hyflo supercel (1 + 2 en poids), développée avec de l'éther de pétrole contenant 1,5 p. 100 d'acétone, les composants A_1, A_2et A_3 ne sont pas séparés du β-carotène. Nous avons donc éliminé cet adsorbant.

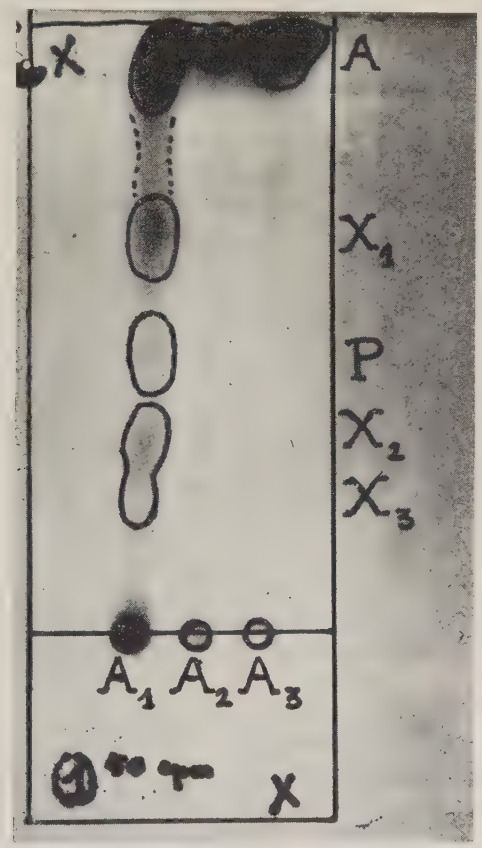


Fig. 13. — *Autoradiogramme d'une microchromatographie des constituants de la fraction A sur chromatoplaque d'acide silicique*(photosynthèse en présence de $^{14}CO_2$).

A_1 : fraction A non purifiée.
A_2 : après une chromatographie sur Al_2O_3.
A_3 : après une seconde chromatographie sur Al_2O_3.
A : β-carotène.
P : phytol
X_1, X_2, X_3 : composés de nature inconnue } taches révélées par $KMnO_4$

L'hydroxyde de calcium est en revanche un bon adsorbant pour chromatographier le β-carotène. On développe la colonne avec de l'éther de pétrole et le pigment obtenu est identique à du β-carotène synthétique. Nous avons ainsi vérifié l'absence d'α-carotène dans nos extraits de feuilles de Tomate et de Maïs.

L'alumine activée Merck est finalement l'adsorbant que nous avons choisi pour purifier le β-carotène. Non seulement le pigment obtenu répond à tous les critères de pureté que nous avons énumérés, mais des autoradiogrammes de chromatoplaques d'acide silicique montrent que le β-carotène n'est plus contaminé après son passage sur colonne d'alumine (fig. 13). Nous avons utilisé pour cette expérience un extrait de feuilles de Tomates ayant fixé du $^{14}CO_2$ pendant 1 heure à la lumière. Dans ces conditions le marquage du pigment et des autres substances de la fraction A est maximum et cependant l'alumine élimine toutes les impuretés radioactives.

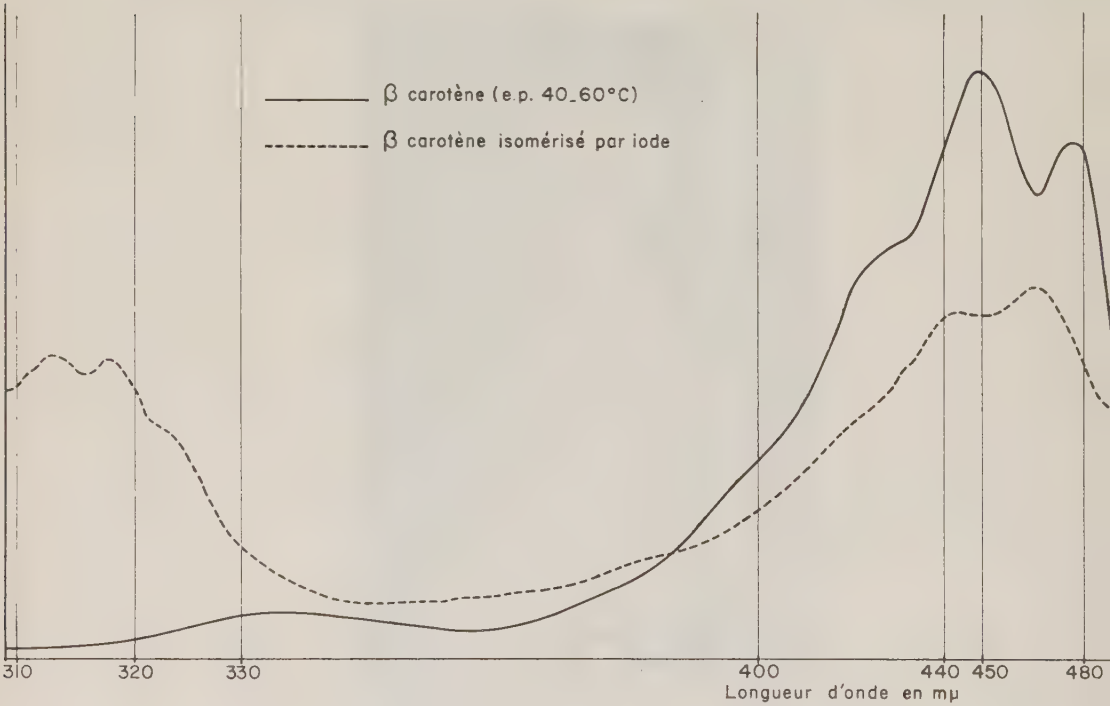


FIG. 14. — *Spectre d'absorption du β-carotène isomérisé par l'iode, en solution dans l'éther de pétrole*

Nous nous sommes particulièrement assurés de l'absence de squalène dans le β-carotène ainsi purifié. Avec l'alumine que nous utilisons, nous avons séparé 14 mg de squalène de 24 μg de β-carotène : le squalène est entièrement élué de la colonne avec 50 ml d'éther de pétrole alors que le β-carotène ne commence à sortir qu'avec de l'éther de pétrole contenant 10 p. 100 d'éther éthylique. Nous avons également vérifié que les stérols restent fixés à la partie supérieure de la colonne d'alumine dans ces conditions.

Dans les expériences réalisées avec des précurseurs radioactifs, la radioactivité spécifique du β-carotène a été calculée après son passage sur alumine. La fraction A est évaporée à sec et reprise dans 20 ml d'éther de pétrole. Cette solution est versée sur une colonne d'alumine (70 × 13 mm). Le développement de la colonne est commencé avec 30 ml d'éther de pétrole, ensuite par 30 ml d'éther de pétrole contenant 3 p. 100 d'éther éthylique. Le β-carotène sort de la colonne avec 100 ml d'éther de pétrole contenant 10 p. 100 d'éther éthylique. Seule la partie médiane de l'anneau

est recueillie. Le β-carotène est repris dans 5 ou 10 ml d'éther de pétrole et dosé par spectrophotométrie à 449 mμ ($E^{1\%}_{1\,cm} = 2\,560$).

Purification du β-carotène par isomérisation à l'iode. — Cependant, lors des expériences d'incorporation de géranylgéraniol et de géranyllinalool, les alcools diterpéniques introduits artificiellement dans les feuilles ne sont pas totalement métabolisés. Un excès se retrouve dans l'insaponifiable et nous avons vérifié que tous ces alcools se déplacent avec le β-carotène dans la fraction A par chromatographie sur cellulose. Dans le cas où les alcools diterpéniques sont tritiés, il nous a semblé nécessaire de pousser plus loin la purification du β-carotène en l'isomérisant par l'iode selon KUHN et LEDERER (1932).

Après dosage du β-carotène tritié extrait des feuilles, dans 50 ml d'éther de pétrole, nous ajoutons environ 10 ml d'une solution de β-carotène HOFFMAN-LAROCHE extraîneur de façon à diluer le β carotène initial à 1/10. La solution résultante est évaporée, le pigment repris dans 3 ml d'éther de pétrole et refroidi à — 8°C. A cette solution on ajoute 2 ml d'une solution d'iode (160 mg dans 100 ml d'éther de pétrole) préalablement refroidie à — 8°C. Une agitation vigoureuse provoque l'apparition d'un précipité noir que l'on filtre sur verre fritté n° 4 recouvert d'une rondelle de papier-filtre. On lave le précipité par de l'éther de pétrole à 0°C, puis on le dissout dans 20 ml d'acétone. Après un repos de 10 à 20 minutes on ajoute 30 ml d'une solution à 2,5 p. 100 de thiosulfate de sodium. Le β carotène isomérisé est extrait par l'éther de pétrole. Le spectre de la figure 14 correspond au β-carotène isomérisé. Toutes ces opérations étant menées quantitativement, il suffit de compter la radioactivité d'une partie aliquote de ce pigment isomérisé et de calculer la radioactivité spécifique du β-carotène en tenant compte de la mesure initale de concentration.

Fraction A'.

Cette fraction correspond à un pic élué de la cellulose entre le β-carotène et la lutéine par éther de pétrole/acétone : 97/3. Dans la feuille de Tabac nous avons montré que cette fraction pouvait contenir de la cryptoxanthine voisinant avec d'autres substances (COSTES, 1958). Nous n'avons pas retrouvé ce pigment dans les feuilles de Maïs et de Tomate.

Après plusieurs chromatographies sur colonnes d'alumine et d'acide silicique, nous avons trouvé que cette fraction était composée d'au moins 5 substances dont la principale a des maximums d'absorption à : 254,5 mμ, 274 mμ, 310 mμ et 397 mμ dans l'éthanol. Elle donne une coloration rouge avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine, violacée avec la benzidine en solution acétique, orange avec l'*o*-dianisidine en solution acétique. La concordance de ces tests conduit à penser que cette substance contient un groupe C=O. L'absence de réaction avec la rhodanine selon WINTERSTEIN et HEGEDUS (1960) permet d'éliminer la fonction aldéhyde. Le spectre d'absorption permet de conclure qu'il s'agit d'un mélange de formes oxydées et réduites de substances quinoniques (CRANE, 1961).

Fraction B.

Composition de la fraction B. — Cette fraction qui comprend la lutéine et la zéaxanthine donne 2 taches par chromatographie sur chromatoplaques d'acide silicique :

B_1 : tache frontale, donnant une fluorescence bleue par exposition à la lampe UV émettant à 366 mμ ;

B_2 : également fluorescente et révélable par $KMnO_4$.

Les autres xanthophylles restent dans la tache de départ (hexane/ac. éthyle : 85/15).

Nous avons vérifié que la fraction B ne contient pas de stérols : le β-sitostérol, le lanostérol et l'agnostérol se déplacent avec la fraction A pendant la chromatographie sur cellulose.

Purification de la lutéine et de la zéaxanthine sur $CaCO_3$. — Les deux impuretés B_1 et B_2 dont nous ignorons la nature disparaissent quand on purifie la lutéine sur $CaCO_3$ (Prolabo, pour analyse). La première moitié du pic d'élution de la lutéine est évaporée à sec et reprise dans quelques ml de benzène. Cette solution est versée sur une colonne de $CaCO_3$ (80 × 13 mm) et la lutéine est éluée par le benzène. La lutéine est alors reprise dans 10 ml d'éthanol, dosée par spectrophotométrie à 445 mμ en prenant comme coefficient d'extinction $E\,^{1\,\%}_{1\,cm} = 2\,550$.

Quand il y a de la zéaxanthine, la fin du pic d'élution de la fraction B est rechromatographiée sur poudre de cellulose en développant avec le mélange éther de pétrole/acétone : 97/3. La zéaxanthine est alors chromatographiée sur $CaCO_3$ comme la lutéine.

Purification de la zéaxanthine sur $Ca(OH)_2$. — Nous avons également séparé la zéaxanthine de la lutéine par chromatographie sur colonne de $Ca(OH)_3$ — (Merck — 70 × 18 mm). En développant la colonne avec du benzène, la lutéine se déplace plus rapidement que la zéaxanthine : les deux xanthophylles sont très bien séparées.

Fractions B', C et D.

Ces fractions ne contiennent aucune impureté fluorescente ou révélable par $SbCl_3$ ou $KMnO_4$ sur les chromatoplaques d'acide silicique. Leur radioactivité est comptée directement ou après une chromatographie supplémentaire sur cellulose. Elles sont reprises dans 5 ml d'éthanol et dosées spectrophotométriquement avec les données suivantes :

	λ max.	$E\,^{1\%}_{1cm}$ d'après Goodwin (1955)
	—	—
lutéine époxyde	442 mμ	2 450
violaxanthine	441 mμ	2 550
néoxanthine	436 mμ	2 270

Dans les tableaux de résultats (12 — 14 — 16), lorsque nous n'indiquons pas la radioactivité spécifique de la violaxanthine, c'est que nous ne l'avons pas séparée de l'auroxanthine, qui souvent, accompagne ce pigment.

Identification des pigments

Après purification, les caroténoïdes ont été caractérisés par leurs spectres d'absorption dans plusieurs solvants, par des réactions colorées et des réactions d'isomérisation. Les résultats sont résumés dans le tableau 5.

Réactions colorées (Karrer *et* Jucker, 1950).

On agite une goutte d'acide formique, ou d'acide sulfurique, ou de solution saturée de trichlorure d'antimoine dans le chloroforme, avec 2 ml de solution des

caroténoïdes dans l'éther de pétrole ou dans l'éthanol. Pour la réaction des groupes époxyde avec l'acide chlorhydrique, on expose pendant 5 minutes une tache d'environ 5 µg de pigment sur papier aux vapeurs d'un flacon ouvert.

Spectres d'absorption dans le visible.

Les spectres sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DK 1 de 500 à 300 mµ. Les longueurs d'onde des maximums d'absorption sont repérées à 1 mµ près. Les figures 14 à 18 représentent les spectres d'absorption des différents

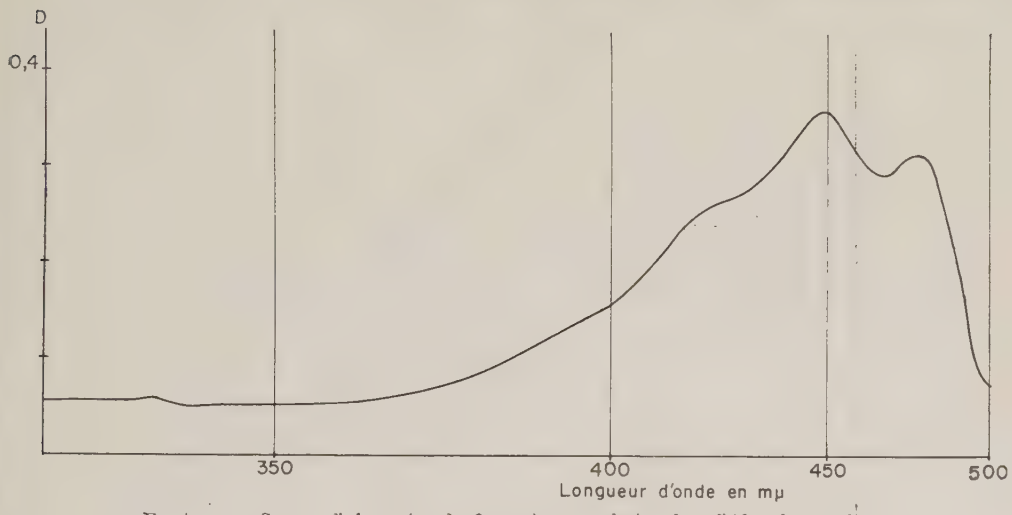


Fig. 15. — *Spectre d'absorption du β-carotène en solution dans l'éther de pétrole, après purification sur alumine*
(feuilles de Maïs)

caroténoïdes dans plusieurs solvants. Dans le tableau 5 les spectres de référence sont empruntés à Karrer et Jucker (1950), Goodwin (1955) et Eichenberger et Grob (1962 *a*).

Réactions d'isomérisation. Identification de l'époxylutéine et de la violaxanthine.

En présence d'acide, les groupes époxy 5,6 et 5′,6′ s'isomérisent en 5,8 et 5′,8′. Ainsi l'époxylutéine donne la flavoxanthine et la violaxanthine donne l'auroxanthine. La vitesse de la réaction d'isomérisation est variable.

Pigment de la fraction B′ = époxylutéine. — Dans la cuve du spectrophotomètre on verse 4 ml de solution éthanolique de fraction B′. On ajoute 2 gouttes d'acide chlorhydrique à 2 p. 100 dans l'eau : à partir de ce moment l'isomérisation est suivie en enregistrant le spectre d'absorption du mélange en fonction du temps. Les spectres de la figure 17, montrent que les pigments obtenus après neutralisation, transfert dans l'éther de pétrole et chromatographie du mélange réactionnel, sont :

— pigment B′, en excès ;

— un pigment dont le spectre est analogue à celui de la flavoxanthine (Strain, 1954).

Le pigment de la fraction B′ qui s'isomérise en flavoxanthine en présence d'acide a donc une fonction époxyde en 5,6.

Par ailleurs les spectres de B' dans le benzène et dans le sulfure de carbone sont en concordance avec ceux donnés par KARRER et JUCKER (1950) pour l'époxylutéine :

	Fraction B' (max. en mμ)	*Époxylutéine* (max. en mμ)
Benzène	(430) — 454 — 480	453 — 482
Sulfure de carbone	(445) — 471 — 501	472 — 501,2
Chloroforme.....	(430) — 456 — 486	

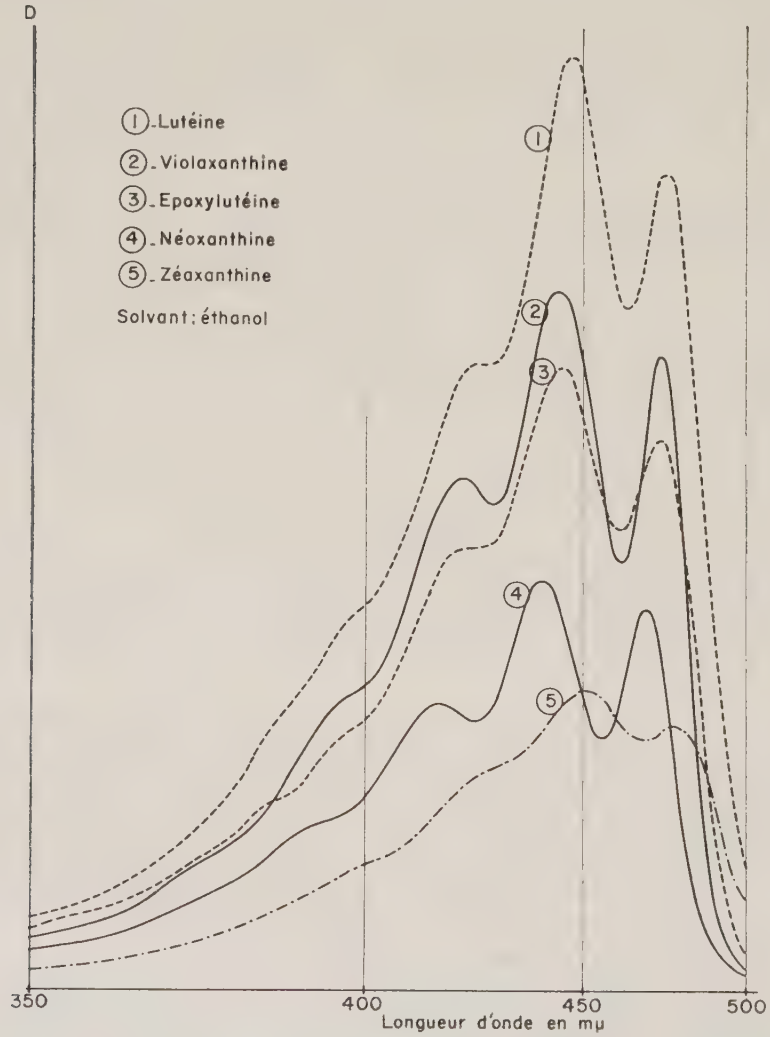


FIG. 16. — *Spectres d'absorption des xanthophylles extraites des feuilles de Tomate en solution dans l'éthanol*

Ce pigment, qui ne forme qu'un seul anneau par chromatographie sur colonne de magnésie (développant : hexane/éther éthylique : 2/1) présente les propriétés suivantes :

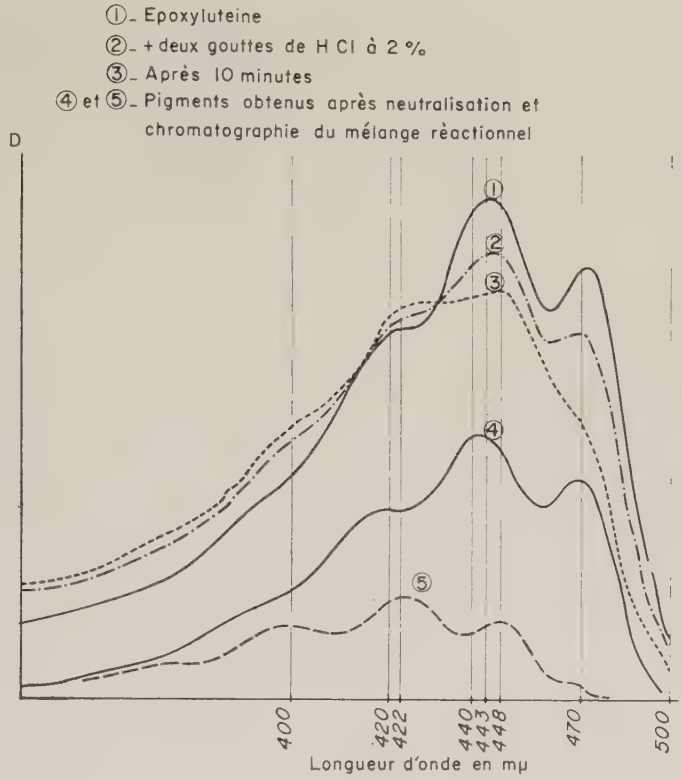


FIG. 17. — *Spectres d'absorption de la solution d'époxylutéine dans l'éthanol, au cours de son isomérisation par l'acide chlorhydrique*

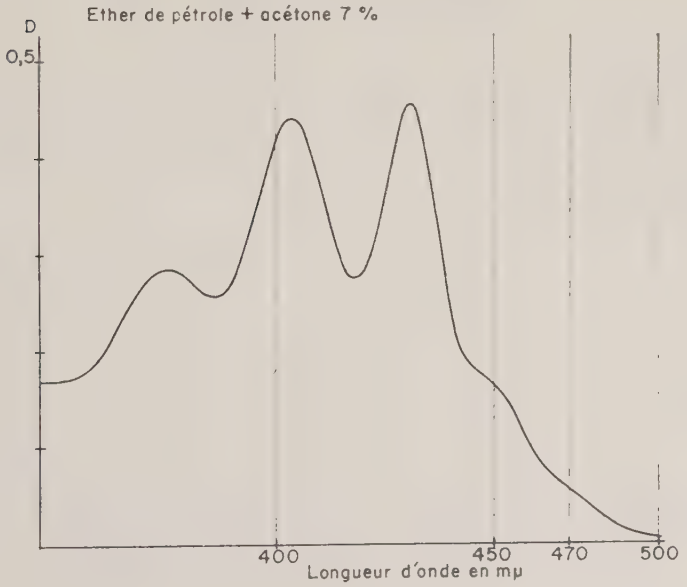


FIG. 18. — *Spectre d'absorption de l'auroxanthine en solution dans l'éther de pétrole contenant 7 p. 100 d'acétone*

TABLEAU 5

Réactions colorées et spectres d'absorption des caroténoïdes foliaires

Pigments	Réactions colorées d'après KARRER et JUCKER (1950)				Spectres d'absorption (λ des maximums d'absorption en mμ)			Spectres de référence (λ des maximums d'absorption en mμ)		
	HCOOH	$SbCl_3$ dans chloroforme	HCl sur papier	H_2SO_4	Hexane	Éthanol	Sulfure de carbone	Hexane	Éthanol	Sulfure de carbone
β carotène	—	bleu	—	bleu	~ 425 449 476		~ 450 482 510	~ 425 450 477		~ 450 485 520
Lutéine	vert	bleu	—	vert ↓ bleu	422 444 472	422 445 475	450 475 504		420 446 476	445 475 508
Zéaxanthine	vert	bleu	—	bleu	~ 425 448 475	~ 426 450 476		447 à 451 477 à 483	448 à 451 478 à 483	
Époxylutéine	vert	bleu	bleu pâle	bleu	418 441 469	420 443 470	~ 445 471 501		442 471	472 501,5
Violaxanthine	bleu	—	bleu foncé	bleu	415 438 468	418 441 470			417 442 471	440 470 501
Néoxanthine	bleu	—	bleu pâle			415 437 466	~ 437 463 493		437 466	463 493
Auroxanthine (violaxanthine isomérisée)			bleu		380 402 426				380 402 427	
Flavoxanthine (époxylutéine isomérisée)			bleu			400 422 448		421 448	421 448	

— par sa forme, son spectre d'absorption est superposable à celui de la lutéine, décalé vers les courtes longueurs d'onde (fig. 16);

— malgré des longueurs d'onde de maximums d'absorption voisines de celles de la violaxanthine, les spectres d'absorption de ces deux pigments sont morphologiquement différents dans l'éthanol, le sulfure de carbone et le chloroforme ;

— sur chromatoplaque d'acide silicique développé par le mélange éther éthylique/hexane : 90/10, ce pigment se déplace avec la même vitesse que la lutéine mais plus rapidement que la violaxanthine.

Le pigment de la fraction B', qu'on trouve toujours en petite quantité dans les feuilles est donc constitué par de l'époxylutéine, également appelée isolutéine (Goodwin, 1952, 1955) et éloxanthine (Hey, 1937 et Karrer et Rutschmann, 1945).

Pigments de la fraction C = violaxanthine. — L'isomérisation est ici très rapide Une solution de pigments de la fraction C ayant le spectre d'absorption de la violaxanthine est évaporée à sec au ballon tournant : le résidu est exposé aux vapeurs d'un flacon de HCl. Repris dans de l'éther de pétrole contenant 7 p. 100 d'acétone, le spectre du pigment isomérisé correspond à celui de l'auroxanthine (fig. 18).

Cette réaction nous permet d'affirmer que le principal pigment de la fraction C est la violaxanthine.

La rapidité de ces isomérisations nous conduit à penser que la flavoxanthine et l'auroxanthine qui accompagnent parfois la violaxanthine dans la fraction C sont des artefacts.

C. Techniques de mesure et de la radioactivité du carbone-14 et du tritium

I. — Mesure de la radioactivité avec un compteur de Geiger-Müller

Au début de ce travail nous avons mesuré la radioactivité des pigments avec un compteur cloche à fenêtre mince (1,9 mg/cm^2) dont le rendement est de 6,1 p. 100 (tension d'alimentation du tube de Geiger-Müller : 1 400 volts). Le bruit de fond est de 60 coups par minute. Toute mesure moyenne ayant une valeur inférieure à 2 fois le bruit de fond est considérée comme non significativement différente de ce bruit de fond.

Une partie aliquote (1 à 2 ml) des solutions des caroténoïdes purifiés est évaporée régulièrement dans des coupelles circulaires à fond plat (d = 28 mm). La couche de pigment déposée (1 à 10 µg) est très mince et l'autoabsorption est négligeable. Nous avons ainsi effectué les premières mesures dans les expériences de photosynthèse en présence de $^{14}CO_2$. Avec cette technique nous avons tracé le diagramme de répartition de la radioactivité le long d'une colonne de cellulose pendant la séparation chromatographique des caroténoïdes marqués au carbone 14 (fig. 9).

Nous avons également déterminé les temps d'exposition des chromatoplaques en présence de films Kodirex afin d'obtenir des autoradiochromatogrammes : une tache ayant une radioactivité de n coups par minute donnera une impression visible sur le film si l'exposition dure $\frac{1\,000}{n}$ jours.

II. — Mesure de la radioactivité avec un compteur a scintillation liquide

C'est avec un appareil Tracerlab LSC-10 B à circuit de coïncidence que nous avons pu mesurer significativement de faibles radioactivités de ^{14}C et que nous avons pu compter le tritium.

Principe et caractéristiques des scintillateurs

La substance radioactive dont on veut mesurer l'activité est dissoute dans un liquide contenant en solution des molécules luminescentes. Ces molécules de scintillateur sont excitées par le rayonnement particulaire (β^- du ^{14}C ou du ^{3}H) et émettent des photons. Ces photons sont reçus par la cathode d'un photomultiplicateur qui expulse des électrons, multiplie ces électrons et donne ainsi naissance à des impulsions électriques dont on peut compter la fréquence (coups par minute).

La solution scintillante que nous avons utilisée a la composition suivante :

2,5-Diphényloxazole (DPO)	4 g
1,4-Di-(2-(5-phényloxazolyl))-Benzène (POPOP)	0,1 g
Toluène	1 litre

Ces scintillateurs excités émettent des photons dans les bandes de longueur d'onde suivantes (Schram, 1963) :

	DPO	POPOP
λ du maximum d'émission, en mμ	365	394
λ moyen (divisant le spectre d'émission en deux parties, chacune ayant le même nombre de photons), en mμ	419	444

Les comptages sont faits dans des fioles de 20 ml remplies par :

Solution radioactive + éthanol	7,6 ml
Solution scintillante (toluène)	12,4 ml

Les substances dont on veut compter la radioactivité peuvent être hydrosolubles ou liposolubles. Le mélange ci-dessus peut maintenir en une seule phase :

0,3 ml de solution aqueuse (+ 7,3 ml d'éthanol)
3 ml d'éther de pétrole (+ 4,6 ml d'éthanol).

Extinction. Décoloration des pigments

Lorsqu'on fait des mesures de radioactivité sur les différentes catégories de substances isolées d'une feuille, en vue de dresser un bilan de radioactivité, il faut que les comptages soient tous réalisés avec le même rendement. Or les solutions de caroténoïdes absorbent toutes entre 350 et 500 mμ, dans la zone d'émission maximum des scintillateurs. Si l'on mélange une solution radioactive de caroténoïdes avec la

solution scintillante, il se produit une extinction de fluorescence (*quenching*), variable avec la concentration en pigment.

Nous avons mesuré l'extinction exercée par une solution de β-carotène, de

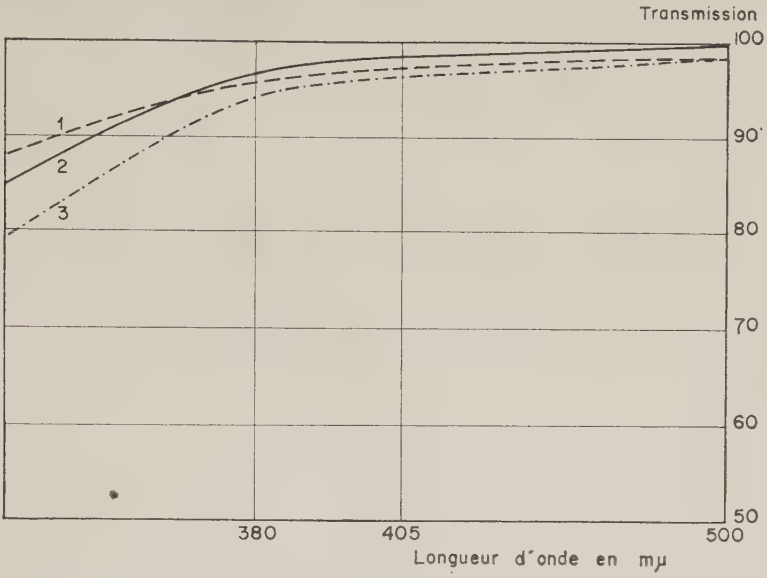


FIG. 19. — *Spectres de transmission de solutions de caroténoïdes après décoloration par la lumière ultraviolette*
1. Solution de lutéine après exposition 13 heures à 366 mμ
($D\ ^{1\ cm}_{445}$ initale = 0,340) — Éthanol
2. Solution de β carotène après exposition 7 heures à 366 mμ
($D\ ^{1cm}_{450}$ initiale = 0,100) — Hexane
3. Même solution après exposition 7 heures à 254 mμ

concentration correspondant à celle de nos échantillons, sur le comptage d'un échantillon d'eau tritiée :

	sans extinction	avec extinction
Eau tritiée	0,1 ml	0,1 ml
Solution scintillante	12,4	12,4
Éthanol	6,1	6,1
Solution de β-carotène dans l'éther de pétrole ($D^{1\ cm}_{450}$ = 0,350).....	0	1,4
Éther de pétrole	1,4	0
Radioactivité mesurée (c.p.m.)	148 993	114 581
	100 %	77 %
Pourcentage d'extinction	0	23 %

Il est donc nécessaire de décolorer les solutions de pigment avant comptage pour obtenir une bonne transparence entre 360 et 500 mμ. Les caroténoïdes sont décolorés par exposition des solutions au rayonnement d'une lampe UV : la décoloration est plus rapide pour les solutions dans l'éther de pétrole (24 heures) que pour les

solutions dans l'éthanol (4 à 5 jours). Les spectres de transmission et d'absorption des solutions décolorées montrent que la transparence est assurée entre 360 et 500 mμ (fig. 19).

Les courbes de la figure 20 nous montrent que des volumes croissants (de 0,5 ml à 3 ml) de lutéine tritiée en solution éthanolique, n'abaissent pratiquement pas les radioactivités mesurées après décoloration : il n'y a plus d'extinction.

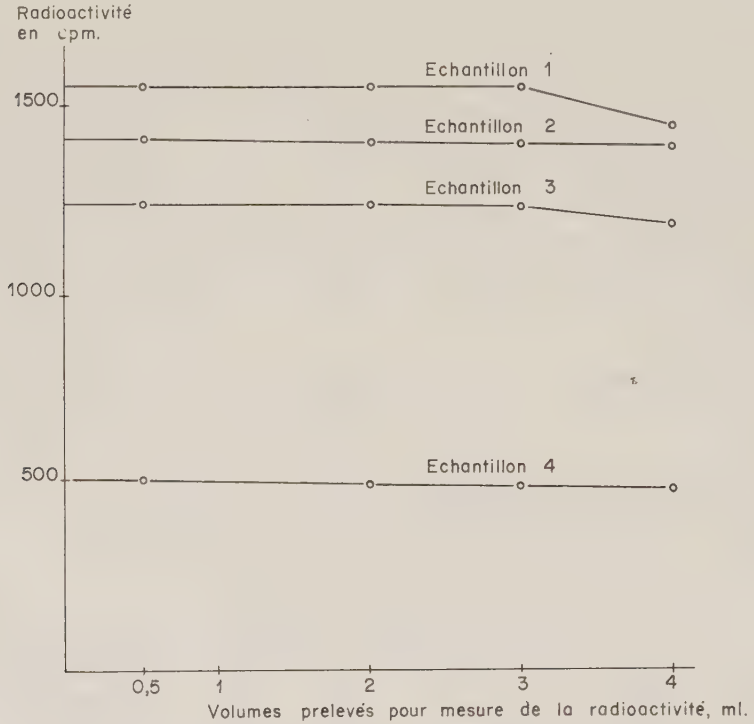


FIG. 20. — *Courbes montrant l'absence d'extinction de plusieurs solutions de lutéine tritiée, après décoloration à la lumière ultraviolette*

Conditions des mesures de la radioactivité de ^{14}C et de ^{3}H

Avec un compteur à scintillation liquide on peut déterminer le rendement des mesures de radioactivité en faisant varier les 3 paramètres suivants, pour un mélange scintillant donné :

— tension appliquée aux photomultiplicateurs (HT) ;

— seuil énergétique en dessous duquel les impulsions ne sont pas comptées *(overpulse level : OL)* ;

— gain des amplificateurs.

Ce gain étant réglé, nous avons choisi les conditions indiquées dans le tableau 6 pour mesurer les radioactivités de ^{14}C et de ^{3}H. Les rendements ont été calculés à l'aide de fioles étalons en tenant compte de la décroissance de radioactivité dans le cas du tritium.

La figure 21 représente le domaine de linéarité des mesures pour le carbone-14.

TABLEAU 6

Caractéristiques du compteur à scintillation liquide pour la mesure des radioactivités du Carbone-14 et du Tritium

	Carbone-14	Tritium	
Tension appliquée aux photomultiplicateurs	1 300 volts	1 700 volts	1 900 volts
Overpulse Level	75	50	50
Rendement du compteur	70 %	4,6 %	4,4 %
Bruit de fond (c.p.m.)	60	100-110	80-90
Échelle linéaire	de 0 à 80 000 c.p.m.	de 0 à 40 000 c.p.m.	de 0 à 70 000 c.p.m.

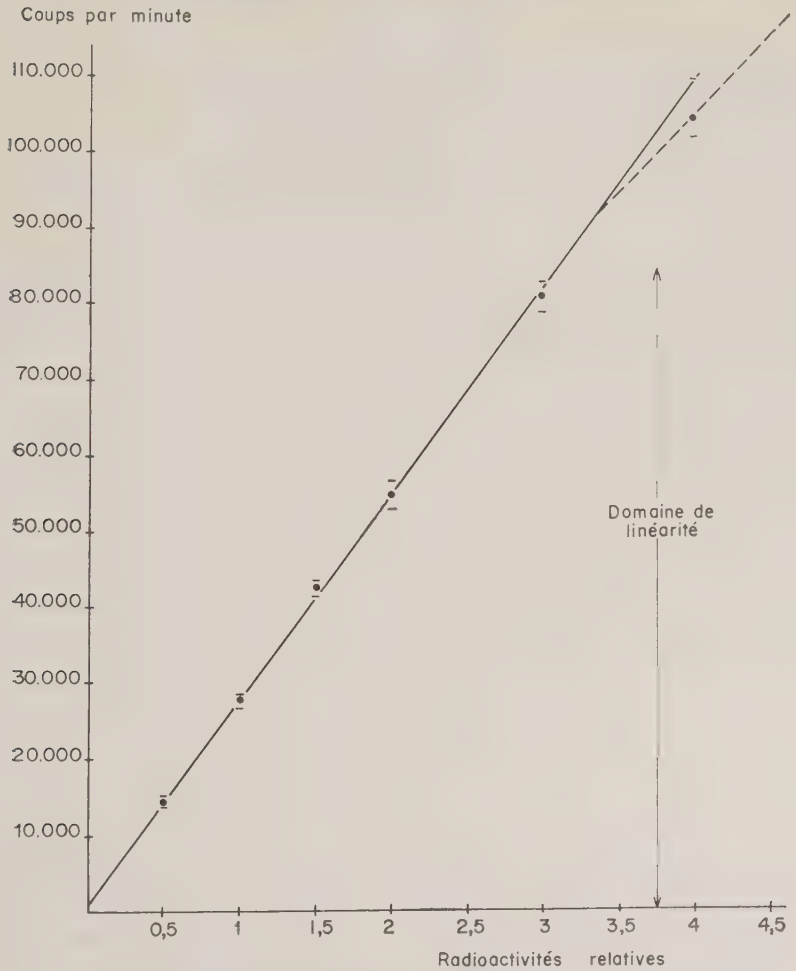


FIG. 21. — *Courbe d'étalonnage du compteur de radioactivité par scintillation liquide, montrant le domaine de linéarité des mesures pour le Carbone-14*

Signification des mesures de radioactivité.
Mesure des faibles radioactivités

Précision des mesures.

Nous avons étudié la répartition statistique des mesures de bruit de fond en faisant sur plusieurs fioles des séries de 10 comptages de 10 minutes et nous avons calculé :

— la moyenne des mesures x_i : $\bar{x} = \frac{\Sigma x_i}{10}$

— l'estimation de l'écart-type s_x de cette distribution des mesures x_i :

$$s_x = \sqrt{\frac{\Sigma (x_i - \bar{x})^2}{9}}$$

— l'estimation de l'écart-type $s_{\bar{x}}$ de la distribution des moyennes $\bar{x}$:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{10}}$$

A l'aide de ces données nous savons que toute mesure x_i de 10 minutes a 95 p. 100 de chances de se trouver dans l'intervalle :

$$\bar{x} - 2\, s_x < x_i < \bar{x} + 2\, s_x$$

et nous pouvons exprimer la reproductibilité des comptages au cours de la journée :

$$\pm \frac{2\, s_x \times 100}{\bar{x}}$$

Nous savons également que la valeur vraie de la moyenne $\bar{x}$ a 95 p. 100 de chances de se trouver dans l'intervalle :

$$\bar{x} - 2{,}26\, s_{\bar{x}} < \bar{x} < \bar{x} + 2{,}26\, s_{\bar{x}}$$

le coefficient 2,26 représentant la valeur du t de Student pour une série de 10 mesures. Nous pouvons ainsi calculer l'erreur relative faite sur la détermination de la moyenne de 10 mesures :

$$\pm\ 2{,}26\, \frac{s_{\bar{x}} \times 100}{\bar{x}}$$

Une série de 10 mesures de bruit de fond sur 3 fioles (comptages de 10 mn) nous a donné les résultats suivants, l'appareil étant réglé pour les comptages de ^{14}C :

	Fiole 1 0,5 ml éther de pétrole 7,1 ml éthanol	Fiole 2 7,6 ml éthanol	Fiole 3 7,6 ml éthanol
Bruit de fond moyen (en c.p.m)	63	62	64
Reproductibilité des mesures (%)	± 7	± 9,3	± 7,7
Erreur relative sur le bruit de fond moyen (%)	± 2,5	± 3,9	± 2,7

Avec le réglage pour les mesures de radioactivité de ^{3}H nous avons obtenu les mêmes valeurs. D'autres mesures nous ont montré que la plus faible reproductibilité ne dépasse pas $\pm$ 10 p. 100 et que l'erreur relative maximum sur la moyenne des comptages ne dépasse pas $\pm$ 4 p. 100.

Nous considérons donc comme significative toute mesure qui présente avec le bruit de fond une différence supérieure à 10 p. 100.

Mesure des faibles radioactivités par scintillation liquide.

Cela signifie qu'il est possible de mesurer une radioactivité aussi faible que 7 coups par minute pour ^{14}C et de 11 coups par minute pour ^{3}H.

Mais afin d'être sûr du caractère significatif des mesures de faibles radioactivités (entre 0 et 50 c.p.m.) nous avons comparé chaque fois les moyennes $\bar{x}$ et $\bar{x'}$ obtenues à partir de 10 mesures sur l'échantillon radioactif x_i et de 10 mesures de bruit de fond x' (VESSEREAU, 1945).

L'écart-type commun étant calculé par la formule :

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2 + \sum (x'_i - \bar{x'})^2}{18}}$$

et l'écart réduit par :

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{x'}}{s} \sqrt{5}$$

Dans les incubations de caroténoïdes marqués au ^{14}C avec des suspensions de chloroplastes, les mesures de faibles radioactivités ont toujours donné une probabilité de l'écart réduit P (t) inférieure à 0,01. La différence entre les moyennes des bruits de fond et les moyennes des mesures de faibles radioactivités est donc hautement significative.

Calcul des radioactivités spécifiques. Précision

Avant purification, les pigments sont dosés spectrophotométriquement comme il a été indiqué. Après purification, la radioactivité a est déterminée sur une masse m de pigment. La radioactivité spécifique R.S. est le rapport $\frac{a}{m} = \frac{a}{kD}$

D étant la densité optique de la solution. On l'exprime en c.p.m. par mg de pigment. L'erreur relative faite sur la radioactivité spécifique est :

$$\left|\frac{\Delta \text{ R.S.}}{\text{R.S.}}\right| = \left|\frac{\Delta a}{a}\right| + \left|\frac{\Delta D}{D}\right|$$

Or les plus basses mesures de densité optique sont de 0,100 environ, et tout au long de l'échelle des densités optiques l'erreur absolue, ΔD ne dépasse pas $\pm$ 0,002. Donc $\frac{\Delta D}{D}$ est de l'ordre de $\pm$ 2 p. 100 et nous avons vu que l'incertitude relative maximum sur les mesures de radioactivité est de $\pm$ 10 p. 100. Les radioactivités spécifiques sont donc mesurées à $\pm$ 12 p. 100 près, dans les plus mauvaises conditions. En effet 5 séries de mesures sur des solutions de β-carotène et de lutéine

marquées au ^{14}C n'ont pas donné d'écarts maximums supérieurs à ± 12 p. 100 avec les moyennes de radioactivité spécifique.

Séries de mesures	R.S. moyenne en c.p.m./mg	Limites maximums des écarts observés (p. 100)
β-carotène 1	35 500	± 1
2	39 900	± 2
3	38 800	± 1
4	39 900	± 1
5	35 000	± 5
lutéine 1	40 500	± 6,5
2	10 900	± 11,5
3	12 800	± 6
4	17 700	± 2
5	13 300	± 6,5

Établissement d'un bilan de radioactivité

La radioactivité incorporée (R.I.) dans chaque pigment est calculée en multipliant la concentration par la radioactivité spécifique.

On détermine la radioactivité de la solution acétonique d'extraction sur une faible partie aliquote (0,1 ml) : ainsi il n'y a pas d'extinction mesurable due à l'acétone.

Le résidu acétono-insoluble (polysaccharides, protéines etc.) incolore après extraction, est repris, par HCl 6 N. Une hydrolyse du résidu pendant au moins 6 heures à l'ébullition permet de recueillir, après filtrage, une solution dont une partie aliquote (0,2 ml sur 100 ml) est comptée. On détermine ainsi la radioactivité incorporée dans le résidu acétono-insoluble.

La radioactivité totale fixée dans une feuille à un instant donnée peut être estimée par la somme des radioactivités du résidu acétono-insoluble et de l'extrait acétonique. Elle est exprimée en c.p.m. par g de feuille.

D. Techniques d'incorporation de métabolites dans les feuilles et d'incubation avec les chloroplastes

Nous avons été amené à étudier le devenir de plusieurs métabolites marqués au carbone-14 ou au tritium dans les feuilles et particulièrement dans les chloroplastes Avec $^{14}CO_2$, $^{3}H_2O$ ou avec les métabolites fortement polaires (acétate de sodium, mévalonate de potassium) nous avons pu utiliser les techniques classiques d'infiltration ou de flottage (Bandurski, 1949). Mais avec les substances en C_{20} (alcools diterpéniques) ou en C_{40} (caroténoïdes), insolubles dans l'eau, nous avons dû mettre au point nos propres techniques. Dans ce chapitre nous décrivons ces techniques générales, nous réservant de donner plus loin les conditions précises pour chacune des expériences.

I. — Incorporation dans les feuilles par flottage

Description de la technique

C'est une technique dérivée de celle de Bandurski (1949) et nous l'avons utilisée pour les feuilles de Tomate. Sur des Tomates âgées de 2 à 3 mois, on prélève les folioles terminales de feuilles de même rang (4e ou 5e en partant de la plus jeune feuille). La nervure centrale est retirée. Le lot de demi-folioles ainsi obtenu est mis à flotter dans une boîte de Petri (diamètre 150 mm) contenant 50 ml du milieu nutritif suivant :

phosphate monopotassique	2 g par litre
nitrate de calcium	1 g par litre
sulfate de magnésium	0,5 g par litre
pH	4,6

Dans les boîtes de Petri les feuilles sont éclairées uniformément par la lumière blanche de 2 tubes fluorescents (4 200 lux). Les limbes foliaires peuvent rester en survie pendant plus de 24 heures. En combinant deux à deux les demi-folioles, il est possible de réaliser des lots homogènes de limbes foliaires : on peut ainsi comparer un témoin (milieu nutritif seul) à un essai (milieu nutritif + métabolite ou inhibiteur). On peut également étudier la cinétique d'action d'un facteur extérieur (lumière, température, obscurité) sur un lot homogène de folioles.

Solubilisation des métabolites

Les métabolites solubles (ou les inhibiteurs) sont mis en solution dans le milieu nutritif et pénètrent rapidement par les nervures coupées du limbe et par les stomates. C'est ainsi que nous avons introduit l'acétate 2-^{14}C de sodium (C. E. A. 9,3 mCi/mM) et le mévalonate 2-^{14}C de potassium (Amersham — 3,35 mCi/mM) dans les feuilles de Tomate. Pour les alcools diterpéniques, insolubles dans l'eau, la dispersion dans le milieu nutritif est faite avec du *Tween* 80 (mélange d'ester oléique et d'éther de polyoxyéthylène et de plusieurs anhydrides de sorbitol). A la concentration de 0,5 p. 1 000 en volume dans le milieu nutritif on ne constate aucune toxicité de cet agent tensioactif (Krzeminski et Quackenbush, 1960).

Incorporation d'eau tritiée

L'eau tritiée ^3H_2O a également été incorporée par flottage des folioles de Tomate. Mais le plus souvent le pétiole de la foliole plonge dans un bécher de 2 ml contenant 1,5 ml de solution nutritive tritiée. Dans tous les cas, le dispositif d'infiltration est placé dans une chambre à photosynthèse, balayée par un courant d'air desséché (*2l/mn*) afin de réduire l'échange isotopique de ^3H_2O entre l'eau cellulaire et la vapeur d'eau atmosphérique.

II. — Incorporation de $^{14}CO_2$ par photosynthèse

Nous avons fait ces photosynthèses sur des folioles de Tomate, échantillonnées et découpées comme il vient d'être décrit. Les demi-folioles prélevées le soir sur les plantes, restent sur le milieu nutritif pendant 15 heures à l'obscurité. La boîte de Petri est alors placée, à l'obscurité, dans l'appareil qui permet de réaliser des photosynthèses avec des feuilles isolées en présence de $^{14}CO_2$ (fig. 22). Cet appareil comprend un générateur de $^{14}CO_2$ à partir de $Na_2{}^{14}CO_3$ (C. E. A., 13,7 mCi/mM) et une chambre fermée par une plaque de verre. L'étanchéité de la chambre est assurée par des rodages graissés et son volume total est de 1,71 litre. On vérifie d'abord l'étanchéité de la chambre en créant une dépression de 5 cm de mercure (manomètre), le robinet D étant fermé. On ferme le robinet A, on retire le robinet C et l'on met, dans la partie creuse de ce robinet, 0,5 ml de la solution de $Na_2{}^{14}CO_3$. Le robinet C remis en place,

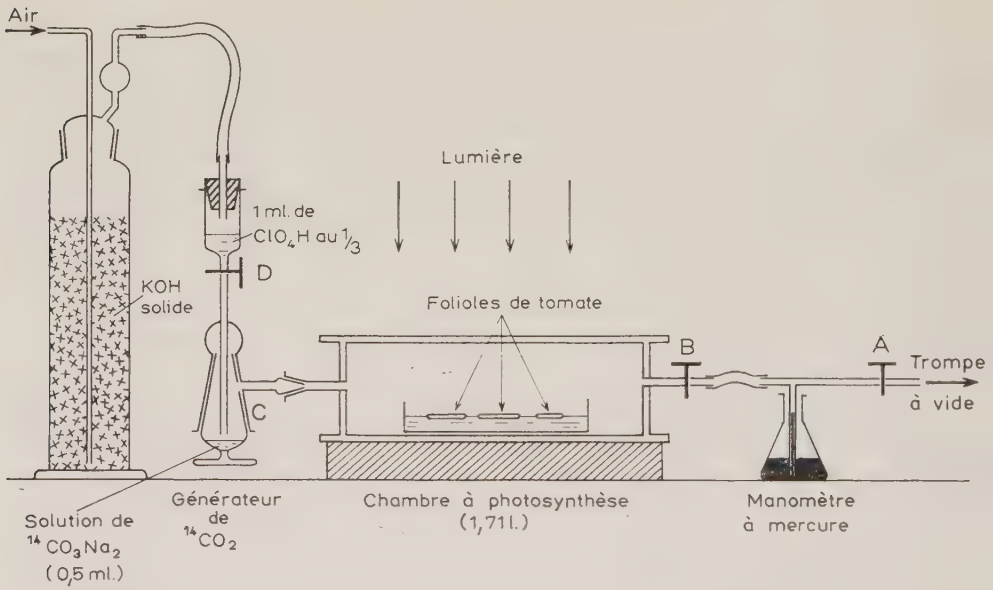


Fig. 22. — *Schéma du montage permettant d'incorporer le $^{14}CO_2$ par photosynthèse dans les limbes foliaires*

on purge la chambre pendant 10 minutes pour la remplir avec de l'air décarbonaté (robinets A, B, C, D ouverts). On ferme alors le robinet D, et aussitôt après, les robinets C et B. On crée ainsi une légère dépression dans la chambre (5 à 6 cm de Hg). On introduit 1 ml de $HClO_4$ dilué 1/3 dans l'entonnoir. On remet en place le bouchon de l'entonnoir et on ouvre lentement le robinet D : aspiré par la dépression, l'acide s'écoule dans la solution de $Na_2{}^{14}CO_3$ et l'on ferme D. On ouvre alors le robinet C, puis lentement, le robinet D pour remettre la chambre à la pression atmosphérique, avec de l'air décarbonaté qui entraîne le $^{14}CO_2$ par barbotage dans le liquide du robinet C. On ferme le robinet D et l'on éclaire (Costes, 1963 *b*).

La lumière est fournie par une lampe à incandescence de 2 000 watts qui donne un éclairement de 10 000 à 30 000 lux suivant sa hauteur au-dessus de la chambre. Le rayonnement infrarouge est filtré par un écran d'eau renouvelée, de 10 cm d'épaisseur. Au bout de 30 minutes à 2 heures d'éclairement, le $^{14}CO_2$ en excès est éliminé par piégeage dans une solution de potasse. La chambre est ouverte, les folioles sont fixées et leurs pigments sont extraits.

III. — Infiltration sous vide dans les feuilles de plantules étiolées de Maïs

Description de la technique

Dans les expériences réalisées avec les plantules étiolées de Maïs, chaque lot est constitué par les premières feuilles de 4 ou 6 plantules de Maïs étiolées, de même âge et de même taille. Les feuilles sont excisées au-dessus de la gaine (longueur moyenne : 120 mm). Cette opération est conduite sous une faible lumière verte. Un lot pèse de 300 mg à 850 mg suivant le nombre de feuilles. Chaque lot de feuilles est placé dans un tube à hémolyse qui contient 0,120 ml de solution à infiltrer : la base de toutes les feuilles (fraîchement coupées) doit plonger dans la goutte de solution. Les tubes sont alors placés dans un dessiccateur contenant P_2O_5. On fait le vide très progressivement dans le dessiccateur, en évitant un dégazage brutal des vaisseaux ligneux des nervures foliaires : on laisse les feuilles sous vide pendant 10 minutes (environ 1 mm de Hg). On sort les tubes du dessiccateur et les feuilles sont éclairées (environ 4 500 lux) : en 2 heures elles absorbent totalement la solution. On fait ensuite absorber 0,1 ml d'eau pour rincer le tube. Après absorption complète on ajoute 2 ml d'une solution contenant :

phosphate monopotassique	0,5 g par litre
nitrate de calcium.....	0,25 g par litre
sulfate de magnésium.....	0,125 g par litre

Les feuilles sont éclairées pendant 30 heures avant fixation et extraction des pigments. Nous avons utilisé cette technique pour les expériences d'incorporation d'acétate 2-^{14}C de sodium, de mévalonate 2-^{14}C de potassium, seuls ou en présence d'alcools diterpéniques. C'est également par cette méthode que nous avons fait pénétrer dans les feuilles le géranylgéraniol et le géranyllinalool tritiés. Les alcools diterpéniques sont en émulsion fine dans le *Tween* 80 à 0,5 p. 1 000.

Le passage pendant 10 minutes dans une atmosphère desséchante et raréfiée ne provoque pas d'altérations visibles sur les feuilles étiolées. Avec les alcools diterpéniques, la totalité de l'émulsion pénètre dans le système vasculaire des feuilles. Mais il est difficile de savoir quelle part des terpénols peut passer des vaisseaux du bois jusque dans les cellules du parenchyme où ils sont métabolisés. Cette fraction est probablement très variable d'un essai à l'autre, ce qui peut expliquer la forte dispersion des résultats qui nous a conduit à faire de nombreuses répétitions.

Conditions expérimentales

Dans les différents types d'expériences réalisées avec le Maïs, les conditions étaient les suivantes :

Dilution d'acétate 2-^{14}C de sodium par les alcools diterpéniques.

	Essais témoins	Géranyllinalool	Isophytol	Géranylgéraniol	Phytol
Acétate 2-^{14}C de sodium	0,1 ml-5 µCi 46 µg	0,1 ml-5 µCi 46 µg	0,1 ml-5 µCi 46 µg	0,1 ml- 5 µCi 46 µg	0,1 ml-5 µCi 46µg
en solution dans *Tween* 80 à 0,5 °/oo — géranyllinalool	0	0,02 ml-76 µg	0	0	0
en solution dans *Tween* 80 à 0,5 °/oo — isophytol	0	0	0,02 ml-68 µg	0	0
en solution dans *Tween* 80 à 0,5 °/oo — géranylgéraniol	0	0	0	0,02 ml-66 µg	0
en solution dans *Tween* 80 à 0,5 °/oo — phytol	0	0	0	0	0,02 ml-64 µg
Tween 80 à 0,5 °/oo	0,02 ml	0	0	0	0
Total	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml

Dilution de mévalonate 2-^{14}C de potassium par le géranylgéraniol

	Essais témoins	Essai + géranylgéraniol
Mévalonate 2-^{14}C de potassium	0,01 ml-1 µCi	0,01 ml-1 µCi
Géranylgéraniol dans *Tween* 80 à 0,5 °/oo	0	0,02 ml-66 µg
Tween 80 à 0,5 °/oo	0,020 ml	0

Infiltration d'alcools diterpéniques tritiés

	Géranylgéraniol dans *Tween* 80 à 0,5 °/oo	Géranyllinalool dans *Tween* 80 à 0,5 °/oo	Poids moyen de chaque lot(g)
Expériences 1-2	0,100 ml-314 µg	0,070 ml-238 µg + 0,030 ml *Tween* 80 à 0,5 °/oo	1
Expériences 3-4	~ 0,070 ml-214 µg	0,060 ml-215 µg	0,75

Dans le dernier groupe d'expériences on a comparé l'incorporation du géranylgéraniol seul à celle du mélange géranylgéraniol plus géranyllinalool :

en solution dans Tween 80 à 0,5 °/oo	géranylgéraniol	:	0,100 ml	314 µg
	géranylgéraniol + géranyllinalool	:	0,050 ml	157 µg
		:	0,050 ml	170 µg
			0,100 ml	327 µg

IV. — Incubation de métabolites radioactifs avec des suspensions de chloroplastes

Principe

Lorsque nous avons voulu utiliser des caroténoïdes marqués au carbone-14 afin de mettre en évidence leurs réactions dans les tissus chlorophylliens, nous nous sommes demandés comment faire pénétrer ces métabolites dans les cellules. Godnev Rotfarb et Shlyk (1960) d'abord, puis Godnev et Rotfarb (1962) ont récemment publié une technique d'infiltration de chlorophylle *a* et de lycopène dans les feuilles d'Oignon sous forme de solution dans l'huile de tournesol. Ayant observé qu'il était possible de mettre en suspension la plupart des caroténoïdes dans une solution de *Tween* 80 à 0,5 p. 1 000, nous avons repris et adapté la technique de Decker et Uehleke (1961). Elle consiste à incuber une suspension de chloroplastes avec une suspension de caroténoïdes marqués au ^{14}C. Suivant la nature des solvants qui solubilisent chaque caroténoïde, le protocole de mise en suspension dans la solution de *Tween* varie.

Extraction et préparation des chloroplastes

A partir de feuilles de Tomate ou de Maïs, les chloroplastes sont extraits d'après la méthode d'Arnon et *al.* (1956). La nervure principale étant retirée, on broie 10 g de limbe foliaire dans 50 ml de tampon phosphate, pH = 7,1 à une température ne

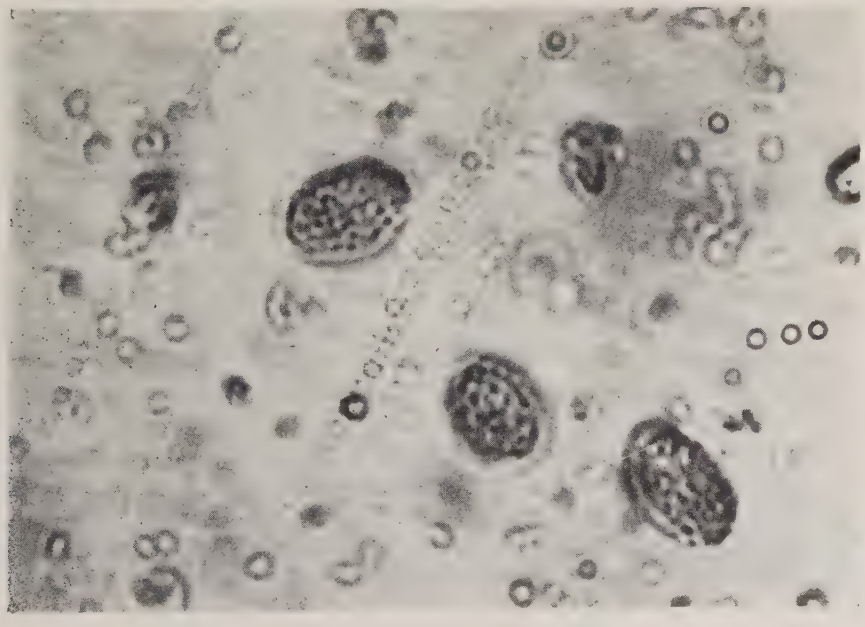


Fig. 23 — *Microphotographie de chloroplastes de feuilles de Maïs, en suspension dans le tampon phosphate M/15, pH 7,1.*
(La longueur de la photographie représente 50 μ)

dépassant pas + 3°C. Le broyage est effectué en deux fois avec un broyeur à hélice Servall : 1 mn 30 s, puis 30 s. Le broyat est rapidement filtré sur une gaze et le filtrat est soumis à deux centrifugations à froid :

— d'abord pendant 2 mn à 300 *g* : le premier culot (débris cellulaires, grains de polysaccharides) est rejeté.

— le surnageant est alors centrifugé pendant 7 mn à 1 000 *g*. Le second culot formé de chloroplastes entiers et de quelques grains d'amidon (fig. 23) n'est pas lavé afin de ne pas solubiliser une partie de l'équipement enzymatique des chloroplastes. Ce culot est homogénéisé dans 25 ml de tampon, avec un gros agitateur à bout rond. La teneur en chlorophylle est mesurée sur 0,5 ml à 1 ml de cette suspension. Les chloroplastes sont utilisés immédiatement après leur préparation.

Mise en suspension des caroténoïdes marqués

A 12 ou 15 ml de *Tween* 80 à 0,5 p. 1 000 on ajoute, avec une pipette plongeant au sein du liquide, une quantité connue de caroténoïdes correspondant à une radioactivité déterminée, en solution dans :

— 1 ou 2 ml d'acétone pour le β-carotène, l'α-carotène, le phytofluène et le ζ-carotène ;

— 3 ou 4 ml d'acétone pour la lutéine et la violaxanthine ;

— 5 ml d'éther éthylique pour le lycopène ;

— 6 ml d'éthanol pour la zéaxanthine.

Les pigments se mettent en suspension dans le mélange *Tween* + solvant organique. La suspension est alors placée pendant environ 1 heure sous vide (0,5 mm Hg), ce qui permet d'éliminer une partie du solvant organique.

Incubation

Pour chaque essai on mélange :

24 ml de suspension tamponnée de chloroplastes ;
12 à 16 ml de suspension de pigment radioactif.

Dans tous les cas, la proportion de solvant organique dans le mélange réactionnel est inférieure à 10 p. 100 en volume et la teneur en *Tween* 80 est inférieure à 0,2 p. 1000.

Dans les essais comparatifs (lumière et obscurité, chloroplastes actifs et dénaturés), les chloroplastes ont la même origine. Le mélange réactionnel est partagé entre deux cuves en Lucoflex fermées qui reçoivent donc chacune 18 à 20 ml du mélange. On place ces cuves dans un bain dont la température varie peu autour de 20°C. Le mélange est agité par un agitateur magnétique situé sous chaque cuve. L'épaisseur de la suspension de chloroplastes se situe entre 0,5 et 1 cm suivant les expériences mais l'agitation permet à tous les éléments chloroplastiques de recevoir le même éclairement dans la même expérience. Dans chaque essai la quantité de chlorophylle totale est de 2 mg à 4 mg. Au bout de temps indiqués dans chaque expérience (de 2 h à 12 h), une partie aliquote du mélange réactionnel est prélevée et fixée par projection dans :

30 ml d'acétone
5 ml d'une solution de potasse à 15 p. 100

Après saponification les caroténoïdes sont extraits et analysés comme il a été décrit plus haut.

E. Synthèse du géranylgéraniol

I. — Principe

Le géranylgéraniol a été synthétisé par transposition allylique du géranyllinalool d'après la technique de Ruzicka et Firmenich (1939). En milieu pyridinique le géranyllinalool, traité par le tribromure de phosphore, donne le bromure de géranylgéranyle. L'acétate de géranylgéranyle obtenu en faisant agir l'acétate de potassium sur ce bromure, est purifié par chromatographie sur acide silicique et par distillation. Une saponification permet d'obtenir le géranylgéraniol que l'on chromatographie et que l'on distille.

II. — Préparation de l'acétate de géranylgéranyle

— Dans 185 ml de pentane on dissout 7,1 g de géranyllinalool, puis 7 ml de pyridine. En refroidissant à — 15°C on ajoute au mélange 1,5 ml de PBr_3 dissous dans 42 ml de pentane : on agite pendant 15 minutes et on laisse reposer 17 heures. Le mélange réactionnel est alors versé sur de la glace pilée et le bromure de géranylgéranyle formé est extrait par du pentane. On ajoute à cette solution 175 ml d'acétone et 21 g de CH_3COOK anhydre. L'extraction du mélange par le benzène donne 6,5 g de produit sec qui contient l'acétate de géranylgéranyle.

— L'acétate de géranylgéranyle repris dans le benzène est purifié sur une colonne d'acide silicique (300 g, 20 mm × 510 mm). Le développant est le benzène et l'on recueille des volumes de 9 ml à la sortie de la colonne. La composition de l'éluat est étudiée par chromatographie sur chromatoplaques d'acide silicique (développant : hexane/acétate d'éthyle : 85/15). Le contenu des tubes numérotés de 83 à 191 donne une seule tache homogène révélée par $KMnO_4$ à 2,5 p. 1000 sur les chromatoplaques. Les éluats de ces tubes sont mélangés. Le test à l'hydroxamate de potassium en présence d'une solution chlorhydrique de $FeCl_3$ donne une coloration rouge avec une goutte de cet éluat. Il s'agit donc bien d'un ester dont le poids sec est : 1,3072 g. Distillé sous pression réduite, cet ester donne deux fractions :

$$\begin{cases} \text{fraction 1 :} & E_{0,004} = 116\text{-}121^{\circ}C — 0{,}218\,7 \text{ g} \\ \text{fraction 2 :} & E_{0,004} = 124\text{-}130^{\circ}C — 0{,}920 \text{ g} \end{cases}$$

Les caractéristiques de la fraction 2 sont les suivantes :

$$\begin{cases} E_{0,01} = 132^{\circ}C \\ n_D^{20} = 1{,}4880 \end{cases}$$

Son spectre infrarouge montre l'absence de bande —OH à 3 300 cm^{-1}, la présence de la bande —C = O des esters à 1 745 cm^{-1} et de la bande du groupe CH_3—CO— à 1 020 cm^{-1} (fig. 24).

Après les analyses il reste 842 mg de cette fraction 2 que l'on saponifie par 40 ml de KOH 0,5 N pendant 3 heures. Le poids moléculaire calculé après titrage

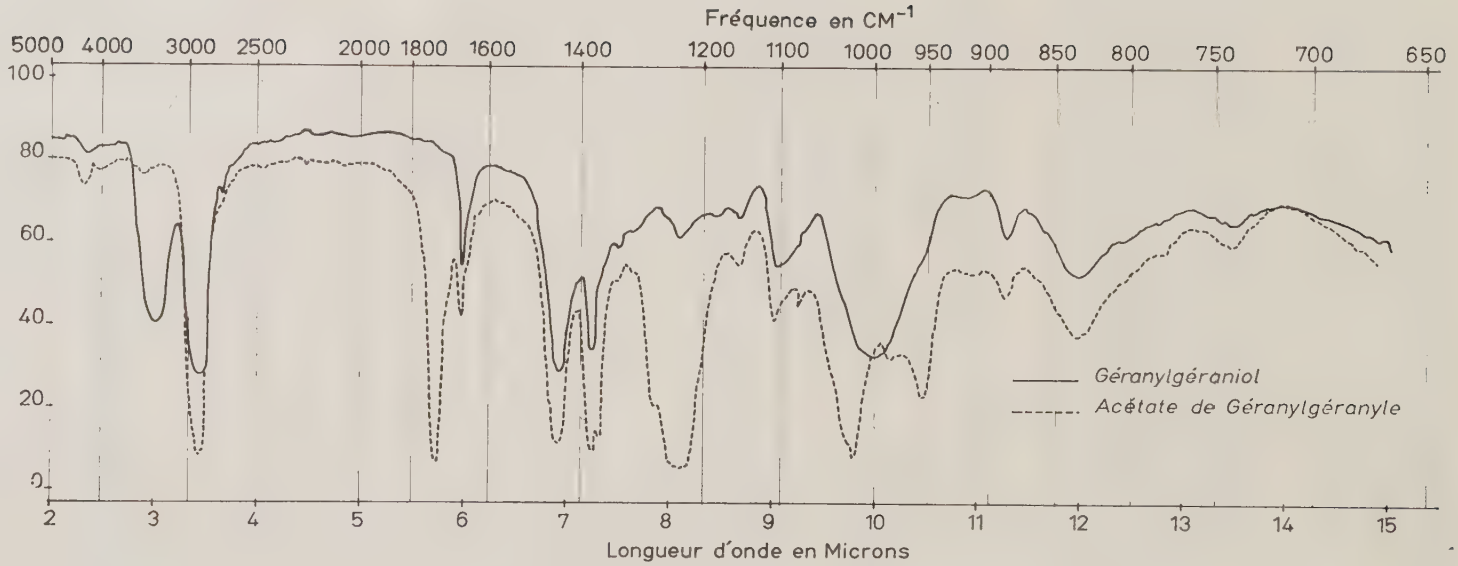


FIG. 24. — *Spectre infrarouge du géranylgéraniol et de l'acétate de géranylgéranyle*

de l'excès de potasse est de 329 (poids moléculaire de l'acétate de géranylgéranyle : 332). La fraction 2 est donc constituée par de l'acétate de géranylgéranyle pur.

$C_{22}H_{36}O_2$ { calculé p. 100 : C 79,46 H 10,92
trouvé p. 100 : C 78,43 H 11,09

III. — Préparation du géranylgéraniol

Après saponification de l'acétate, l'insaponifiable est extrait par de l'éther éthylique. La solution éthérée est lavée à l'eau puis séchée sur Na_2SO_4. Après évaporation de l'éther éthylique, on recueille 0,788 g d'insaponifiable que l'on reprend par du benzène.

Cette solution benzénique est chromatographiée sur une colonne d'acide silicique (36 g, 12 mm × 190 mm). On fractionne l'éluat benzénique en volumes égaux de 9 ml que l'on reçoit dans des tubes numérotés. Dans les tubes 8 à 16 il sort de la colonne 0,707 g d'une substance qui donne une seule tache révélable par $KMnO_4$ sur chromatoplaque. Par distillation on obtient deux fractions :

{ fraction 1 $E_{0,005}$ = 134-136°C 0,121 g
fraction 2 $E_{0,005}$ = 136-137°C 0,443 g

Les caractéristiques de la fraction 2 sont :

$E_{0,01}$ = 140°C
n_D^{20} = 1,4980

Son spectre infrarouge correspond à celui d'un alcool diterpénique insaturé et présente les bandes OH à 3 300 cm^{-1}, C—O de CH_2OH à 1 000 cm^{-1} et CH_2—OH à 1 240 cm^{-1} (Bellamy, 1960). La chromatographie sur chromatoplaques d'acide silicique, l'indice de réfraction et la température d'ébullition montrent que cet alcool diterpénique est différent du géranyllinalool, du phytol et de l'isophytol. Obtenue par saponification de l'acétate de géranylgéranyle, la fraction 2 est constituée par du géranylgéraniol pur (fig. 24).

$C_{20}H_{34}O$ { calculé p. 100 : C 82,69 H 11,80
trouvé p. 100 : C 83,30 H 11,91

C'est cet alcool que nous avons utilisé dans toutes nos expériences.

F. Tritiation du géranylgéraniol et du géranyllinalool

Le Commissariat à l'Énergie Atomique a bien voulu se charger de la tritiation de nos alcools diterpéniques. En tubes scellés les alcools ont été exposés à 2,27 Ci de tritium pendant 3 semaines. Le tritium en excès ayant été éliminé, nous avons commencé à purifier ces alcools.

I. — Extraction par l'hexane

La substance brute tritiée est agitée avec de l'hexane. Une partie du mélange réactionnel est insoluble (produits de polymérisation) : cela assure une première purification, les alcools passant en solution dans l'hexane. La radioactivité de la

partie soluble dans l'hexane est comptée sur une partie aliquote, par scintillation liquide, avec un rendement de 3,5 p. 100. Les comptages montrent que les produits sont tritiés et une microchromatographie des extraits hexaniques montre qu'il y a peu de produits d'altération.

Alcool	Poids initial d'alcool fourni au C. E. A.	Poids d'alcool brut extrait par l'hexane après tritiation	Radioactivité totale fixée (c.p.m.)	Radiocativité spécifique de l'extrait brut (c.p.m./mg)
Géranylgéraniol	103 mg	83 mg soit 80,5 %	$5\,142 \cdot 10^6$	$62 \cdot 10^6$
Géranyllinalool	62,3 mg	50,4 mg soit 81 %	$5\,180 \cdot 10^6$	$102{,}8 \cdot 10^6$

II. — Purification des alcools sur acide silicique

Dilué par un entraîneur pur, non radioactif, l'extrait hexanique est chromatographié sur colonne d'acide silicique (environ 3,5 g d'adsorbant activé pour 100 mg d'alcool diterpénique). L'éluant est de l'hexane contenant 2 p. 100 d'acétate d'éthyle. L'éluat est fractionné en volumes égaux (3,12 ml) et la sortie de l'alcool pur est repérée par microchromatographie d'une partie de chaque fraction sur couches minces d'acide silicique (Demole et Lederer, 1958).

Dilution et rendements après chromatographie

	Géranylgéraniol	Géranyllinalool
Poids initial d'extrait brut	78,85 mg	47,9 mg
Poids d'alcool entraîneur	107 mg	105 mg
Poids total avant chromatographie.	185,85 mg	152,9 mg
Dilution	1/2,357	1/3,192
Poids d'alcool pur recouvré après chromatographie	81,41 mg	115,48 mg
Rendement en poids	*43,8 %*	*75,6 %*
Radioactivité initiale	$5\,142 \cdot 10^6$ c.p.m.	$5\,180 \cdot 10^6$ c.p.m.
Radioactivité recouvrée après chromatographie	$2\,221 \cdot 10^6$ c.p.m	$2\,280 \cdot 10^6$ c.p.m.
Rendement en radioactivité après purification	*43,3 %*	*44 %*

Les produits purifiés et dilués par l'alcool entraîneur ont les activités spécifiques suivantes :

géranylgéraniol $25{,}93 \cdot 10^6$ c.p.m./mg
géranyllinalool $18{,}76 \cdot 10^6$ c.p.m./mg

III. — Essai d'élimination de la radioactivité labile

Les impuretés radioactives ayant été éliminées, il peut rester une radioactivité labile due à des atomes de ^3H facilement échangeables. Nous avons cherché à diminuer cette radioactivité labile en dissolvant les alcools diterpéniques tritiés dans un solvant polaire, le méthanol. Chaque alcool tritié est laissé en solution dans 10 ml de méthanol pendant 24 heures, à la température du laboratoire. La radioactivité spécifique est déterminée, le méthanol est distillé sous vide et l'alcool diterpénique est remis à nouveau en solution dans 10 ml de méthanol. Le tableau 7 montre que la radioactivité spécifique diminue un peu pour le géranylgéraniol et se stabilise comme pour le géranyllinalool, dans les limites des erreurs de mesure.

TABLEAU 7

Élimination de la radioactivité labile du géranyllinalool et du géranylgéraniol tritiés

	Radioactivités spécifiques en c.p.m./µg d'alcool	
	Géranylgéraniol	Géranyllinalool
Solution initiale	25 930	18 760
Solution méthanolique n° 1 : 10 ml	22 500	20 070
Solution méthanolique n° 2 : 10 ml	22 800	21 000
Solution méthanolique n° 3 : 10 ml	20 400	19 200
Solution finale *Tween* 80 (0,5 ‰) 10 ml	19 500 3 140 µg/ml	20 000 3 400 µg/ml

Il y avait donc peu de radioactivité labile dans nos échantillons. A la fin de ces opérations, les alcools tritiés sont mis en suspension dans le *Tween* 80 à 0,5 p. 1 000 afin d'être infiltrés dans les feuilles.

G. Techniques de biosynthèse des caroténoïdes marqués au carbone-14

Nous avons préparé du phytofluène, du ζ-carotène, du lycopène, du β-carotène, de l'α-carotène, de la lutéine, de la zéaxanthine et de la violaxanthine marqués au ^{14}C par biosynthèse à partir de $^{14}CO_2$ ou de $^{14}CH_3$—COONa avec plusieurs systèmes biologiques.

I. — Préparations a partir de feuilles de Tomate : β-carotène, lutéine, violaxanthine

On fait des photosynthèses à partir de $^{14}CO_2$ suivant la technique décrite dans un précédent chapitre. C'est ainsi qu'après les purifications par chromatographie sur colonne indiquées plus haut, on obtient du β-carotène ^{14}C, de la lutéine ^{14}C et de la violaxanthine ^{14}C. Le β-carotène ^{14}C a été recristallisé à partir d'une solution éthéropétrolique.

L'absence de bande d'absorption dans le spectre ultraviolet et d'impuretés révélables sur les chromatoplaques nous a servi de critère de pureté. Les radioactivités spécifiques des pigments marqués au ^{14}C sont données dans les différentes expériences où ils ont été utilisés comme précurseurs radioactifs (incubations avec des chloroplastes).

II. — Préparations a partir de racines de Carotte : phytofluène, ζ-carotène et α-carotène

Principe

En incubant des rondelles de racines de Carotte avec une solution d'acétate de sodium 2-^{14}C, à la lumière, la biosynthèse des caroténoïdes est suffisamment active pour obtenir une radioactivité spécifique assez élevée dans ces pigments.

Incubation avec $^{14}CH_3$—COONa

On place 45 rondelles de Carotte, épaisses d'environ 5 mm, sur milieu radioactif dans deux boîtes de Petri, situées dans une enceinte fermée et éclairée.

milieu dans chaque boite de Petri :		$^{14}CH_3$ COONa (10 mCi/mM)	75 µCi 615 µg
		eau bipermutée	30 ml
Boite 1 : 21 rondelles	71,5 g		
Boite 2 : 24 rondelles	84,2 g		
	155,7 g		

On assure une circulation d'air dans l'enceinte et le CO_2 expiré est piégé par une solution de potasse à 15 p. 100. L'intensité lumineuse au niveau des rondelles est de 4 500 lux et la température est de 25°C ± 2°C. L'expérience a duré 47 h 30 mn.

Extraction et séparation chromatographique des caroténoïdes

Par 3 fois on broie les rondelles au broyeur Servall avec successivement :

200 ml d'acétone
150 ml d'acétone
200 ml d'éther de pétrole

Après rinçage par 300 ml d'acétone, puis par 300 ml d'éther de pétrole, la pulpe est complètement décolorée.

Les caroténoïdes sont transférés quantitativement dans 1 litre d'éther de pétrole par 10 agitations successives dans une ampoule à décanter de 2 litres. L'acétone de l'épiphase est éliminée par lavage à l'eau. La solution éthéropétrolique est séchée évaporée à sec et les pigments sont repris dans 100 ml d'éther de pétrole. Les caroténoïdes sont séparés en carotènes et xanthophylles sur une colonne de cellulose (93 g, 250 mm × 35 mm).:

— l'éther de pétrole élue les carotènes repris dans 50 ml ;

— le mélange éther de pétrole/acétone : 90/10 élue les xanthophylles et des traces de chlorophylles.

Les carotènes sont séparés sur une colonne de $Ca(OH)_2$ Merck (210 mm × 30 mm) Le chromatogramme est développé avec de l'éther de pétrole (40°-60°C). L'hydroxyde de calcium résout le mélange en 9 anneaux colorés et une bande frontale fluorescente. Les zones étudiées sont les suivantes, de bas en haut de la colonne :

A (incolore — fluorescence verte) : phytoène
phytofluène
B (jaune orangé) : α carotène + phytofluène
C (rose orangé) : β carotène
D (jaune très pâle) : ζ carotène
E (rose orangé) : carotène X

Les zones A, B et C sont éluées avec de l'éther de pétrole.

Les zones D et E sont éluées après découpage de la colonne, avec le mélange éther de pétrole/acétone : 90/10.

Purification des carotènes

Fraction A.

Sur colonne d'alumine Merck (110 mm × 18 mm).

— Le phytoène (A_1) est élué par éther de pétrole/éther éthylique : 97/3. Ce pigment est impur. Repurifié sur alumine, il s'est totalement dégradé.

— Le phytofluène (A_2) est élué par éther de pétrole/éther éthylique : 97/3. Il est repurifié sur colonne d'alumine avec le même solvant de développement.

Fraction B.

Cette fraction est purifiée par 2 chromatographies successives sur alumine :

colonne : 105 mm × 14 mm
développant : éther de pétrole/éther éthylique 90/10 } α carotène phytofluène

colonne : 110 mm × 18 mm
développant : éther de pétrole/éther éthylique 97/3 } α carotène pur

Fraction C.

Cette fraction est chromatographiée sur $Ca(OH)_2$ Merck (145 mm × 30 mm). Le développant est l'éther de pétrole. On obtient du β-carotène pur.

Fractions D et E.

Ces fractions sont chromatographiées sur colonnes d'alumine (110 mm × 18 mm). Les impuretés sont éliminées par :

Fraction D
- éther de pétrole/éther éthylique : 90/10 (200 ml)
- éther de pétrole/éther éthylique : 80/20 (200ml) ⟶
- ζ carotène pur (Nash, Quackenbush et Porter, 1948)

Fraction E
- éther de pétrole/éther éthylique : 90/10 (100 ml)
- éther de pétrole/éther éthylique : 80/20 (100 ml)
- éther de pétrole/éther éthylique : 70/30 (200 ml)
- éther de pétrole/éther éthylique : 60/40 (200 ml) ⟶ carotène X de nature inconnue (spectre dans l'éther de pétrole : 434 — 459 — 490 mμ)

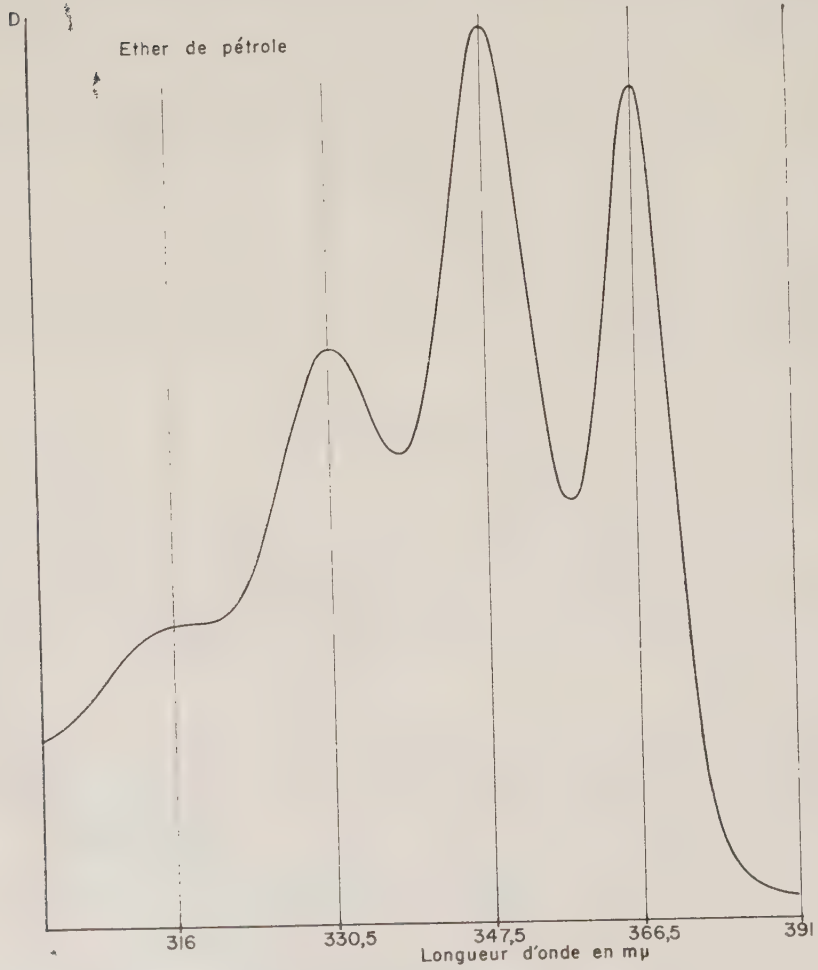


Fig. 25. — *Spectre d'absorption du Phytofluène-^{14}C extrait des racines de Carotte incubées avec de l'acétate-2-^{14}C de sodium*

(Solvant : éther de pétrole 40°C-60°C.)

Critères de pureté.

Ainsi purifiés le phytofluène, les carotènes α, β et ζ répondent aux critères suivants :

— absence de bandes d'absorption dans l'UV. lointain (jusqu'à 230 mμ) ;
— absence de taches révélables par $KMnO_4$, fluorescentes en ultraviolet ou

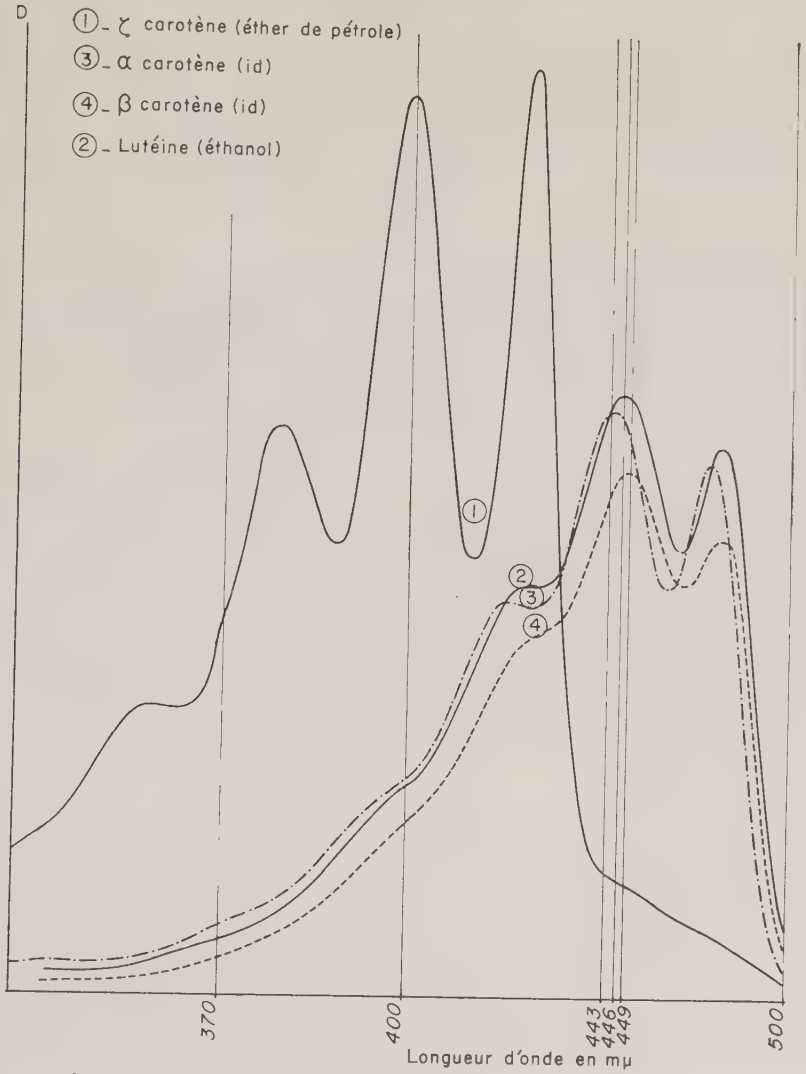


Fig. 26. — *Spectre d'absorption des caroténoïdes extraits des racines de Carotte incubées avec de l'acétate-2-^{14}C de sodium*

absorbant à 254 mμ quand les carotènes sont chromatographiés sur chromatoplaques d'acide silicique avec les deux systèmes de solvants suivants :

éther de pétrole ;
éther de pétrole/acétate d'éthyle : 85/15.

Purification des xanthophylles

Les xanthophylles de la racine de Carotte sont soumises à une seconde chromatographie sur colonne de cellulose (220 mm × 30 mm). Le mélange éther de pétrole/acétone : 97/3 élue deux fractions :

F_1 (jaune pâle)
F_2 (jaune orangé)

Ces deux fractions sont rechromatographiées en milieu benzénique sur $CaCO_3$:

Fraction F_1 : colonne de 80 mm × 14 mm ⟶ pigment Y, de nature inconnue (spectres dans l'éthanol : 418 — 439 — 467 mμ).

Fraction F_2 : colonne de 95 mm × 17 mm ⟶ lutéine

Résultats

Les radioactivités spécifiques sont calculées pour chacun des pigments obtenus purs après mesure des concentrations par spectrophotométrie ($E^{1\%}_{1\,cm}$ donnés par Goodwin, 1955) et des radioactivités par scintillation liquide. Pendant l'incubation, le CO_2 dégagé par respiration à partir des rondelles de Carotte a une radioactivité de 246 900 c.p.m., soit 1 590 c.p.m. dégagé par g de tissu frais.

TABLEAU 8

Caractéristiques des caroténoïdes radioactifs extraits des racines de Carotte (^{14}C)

Pigment $E^{1\%}_{1\,cm}$	Radioactivité spécifique c.p.m./mg de caroténoïde purifié	λ des maximums d'absorption dans l'éther de pétrole (mμ)
Phytofluène (1540)	54 600	330,5 — 347,5 — 366,5
ζ-carotène (2270)	6 900	359,5 — 378 — 399 — 424
β-carotène (2560)	10 150	425 — 449 — 476
α-carotène (2720)	9 050	~ 394 — 419 — 443 — 472
Lutéine (2550)	3 400	422 — 446 — 474 (éthanol)

Les résultats sont consignés dans le tableau 8 et les spectres des pigments purifiés correspondent aux figures 25 et 26.

III. — Préparation a partir de fruit de Tomate : lycopène

Principe

Suivant une technique mise au point par Zabin (1957) nous avons synthétisé du lycopène marqué au ^{14}C en incubant des fruits de Tomate avec de l'acétate de sodium 2-^{14}C, à la lumière.

Incubation

On utilise 3 tomates pesant au total 196,6 g. Avec un perce-bouchon on creuse un puits jusque dans la zone médullaire du fruit. Dans chaque fruit on met 0,6 ml d'une solution de $^{14}CH_3$ — COONa (10 mCi/mM) représentant :

246 µg.
30 µCi

Les puits sont rebouchés et les tomates sont laissées pendant 48 heures à la température de 25°C ± 1°C, avec un éclairement de 4 500 lux, dans une chambre balayée par de l'air décarbonaté (1,5 l/mn). Le CO_2 dégagé par la respiration des tissus est piégé par une solution concentrée de NaOH.

Extraction des caroténoïdes

Les fruits sont broyés en 4 fois avec les solvants suivants :

200 ml d'acétone,
250 ml du mélange acétone/éther de pétrole : 1/1,
250 ml d'éther de pétrole,
250 ml d'éther de pétrole.

On obtient ainsi une décoloration complète de la pulpe après filtrage sur Buchner. Les pigments sont alors transférés dans environ 800 ml d'éther de pétrole.

Séparation chromatographique des xanthophylles et des polyènes

La solution éthéropétrolique des pigments est chromatographiée une première fois sur une colonne de cellulose. Il faut deux colonnes de 250 mm × 35 mm pour séparer correctement les caroténoïdes en polyènes (carotènes et phytofluène) élués par l'éther de pétrole, et en xanthophylles éluées par de l'éther de pétrole contenant 10 p. 100 d'acétone.

Séparation et purification des carotènes

La solution des polyènes est rechromatographiée sur une colonne de cellulose (250 mm × 30 mm) afin de s'assurer de l'absence de xanthophylles dans cette fraction. Les polyènes sont repris dans 500 ml d'éther de pétrole et sont séparés sur colonne de $Ca(OH)_2$ (200 mm × 30 mm). Le solvant de développement étant l'éther de pétrole, on obtient une résolution des pigments en 4 zones principales, de bas en haut de la colonne :

A (incolore—fluorescence verte) : phytofluène
B (rose orange) : β carotène + phytofluène
C (jaune pâle) : ζ carotène
D (rouge brique) : lycopène

Les zones A et B sont éluées de la colonne respectivement avec 200 et 250 ml d'éther de pétrole. Les zones C et D sont éluées après découpage de la colonne par le mélange éther de pétrole/acétone : 90/10.

Comme pour les polyènes radioactifs de l'extrait de Carotte, le phytofluène, le β-carotène et le ζ-carotène ont été purifiés chacun par deux chromatographies sur Al_2O_3. Les caractéristiques des spectres des produits obtenus sont réunis dans le tableau 9.

Purification du lycopène

La fraction D est rechromatographiée sur Al_2O_3 (élution par éther de pétrole-acétone : 80/20). L'éluat est évaporé à sec et repris dans environ 50 ml d'éther de

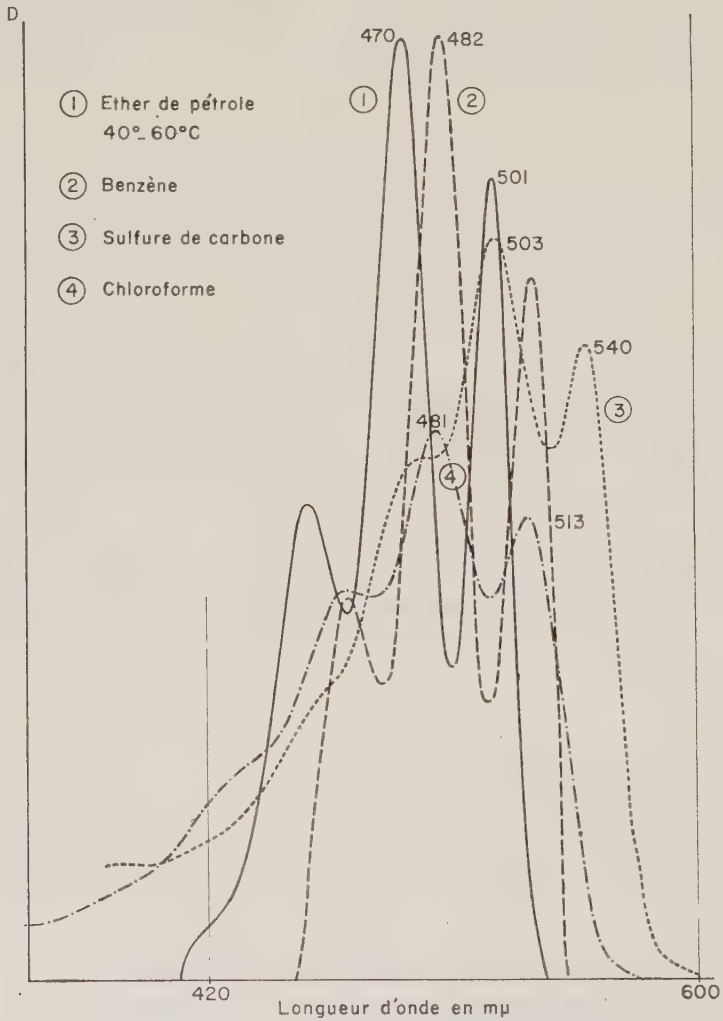


FIG. 27. — *Néolycopène-^{14}C extrait de fruits de Tomate incubés avec de l'acétate-2-^{14}C de sodium : spectres d'absorption dans plusieurs solvants*

pétrole. Cette solution est laissée 48 heures à — 30°C, à l'obscurité. Le pigment cristallise en aiguilles rouges qui, examinées au microscope, correspondent aux cristaux du lycopène (KARRER et JUCKER, 1950). Les cristaux sont filtrés, rincés par du

méthanol à — 10°C. Le pigment est redissous dans 50 ml d'éther de pétrole : ses spectres d'absorption (tabl. 9 et fig. 27) permettent de l'identifier au néolycopène (Goodwin, 1955; Karrer et Jucker, 1950; Benedict, Fuller et Bergeron, 1961)

Séparation et purification des principales xanthophylles

Les xanthophylles sont rechromatographiées sur une colonne de cellulose (270 mm × 35 mm). Le mélange éther de pétrole/acétone : 97/3 élue deux principales fractions dont les caractéristiques sont les suivantes :

		λ maximums :
F_1 (rose pâle)	⟶ solution éthéropétrolique	433 — 469,5 — 500,5 mμ
F_2 (jaune orangé)	⟶ solution éthéropétrolique	422 — 444 — 472 mμ

TABLEAU 9

Caractéristiques des caroténoïdes radioactifs extraits des fruits de Tomate (^{14}C)

Pigment ($E^{1\%}_{1\,cm}$)	Radioactivité spécifique c.p.m. par mg de caroténoïde purifié	λ des maximums d'absorption dans le solvant indiqué (en mμ)	
Phytofluène (1540)	21 850	éther de pétrole	331 — 347 — 366
ζ-carotène (2270)	12 000	éther de pétrole	378 — 400 — 425
Néolycopène (2260)	3 250	éther de pétrole	444 — 470 — 501
		sulfure de carbone	475 — 503 — 540
		benzène	456 — 482 — 516
		chloroforme	455 — 481 — 513
Lycophylle (2260)	1re chromatographie 5 910 2e chromatographie 7 200	éthanol	445 — 473 — 503
		éther de pétrole	442 — 468 — 499
		sulfure de carbone	475 — 504 — 541
		benzène	455 — 483 — 516
Lutéine (2550)	5 100	éthanol	422 — 445 — 473

Le pigment correspondant à la fraction F_1 est chromatographié une 3e fois sur cellulose et nous constatons qu'il n'est pas élué par l'éther de pétrole, mais par de l'éther de pétrole contenant 3 p. 100 d'acétone. Malgré un spectre d'absorption visible identique à celui du néolycopène, il s'agit bien d'une xanthophylle : la lycophylle (2 — OH) ou la lycoxanthine (1 — OH). Le dernier éluat est évaporé, repris dans 20 ml de benzène et chromatographié sur $Ca(OH)_2$ (130 mm × 18 mm). Le benzène résout ce pigment en deux zones sur la colonne :

L_1 (rose pâle), éluée la première dont le spectre dans l'éther de pétrole a 3 maximums d'absorption :
443 — 467 — 498 mμ

L_2 (rose), éluée la seconde présente le spectre d'absorption suivant dans l'éther de pétrole : 443 — 468 — 499 mμ

La fraction L_1 se révèle impure (absorption dans l'ultraviolet) et nous n'avons pas déterminé sa radioactivité spécifique. Moins fortement adsorbée que L_2 sur hydroxyde de calcium, nous pensons que L_1 correspond à la lycoxanthine d'après Karrer et Jucker (1950). Le pigment L_2, dont nous avons fait le spectre dans plusieurs solvants (voir tabl. 9 et fig. 28) est de la lycophylle, identifiée d'après les données spectrophotométriques de Benedict, Fuller et Bergeron (1961).

Sur chromatoplaque d'acide silicique la lycophylle se révèle pure (solvant de Grob et *al.*, 1961 *b*). Soumise à une seconde chromatographie sur colonne de $Ca(OH)_2$ en milieu benzénique, elle ne se résout pas en plusieurs zones.

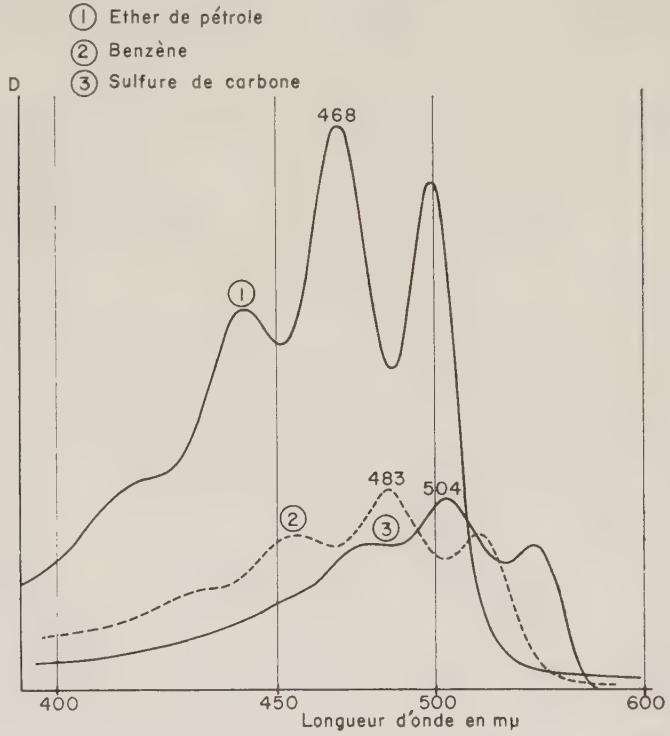


Fig. 28. — *Lycophylle-^{14}C extraite de fruits de Tomate incubés avec de l'acétate-2-^{14}C de sodium : spectres d'absorption dans plusieurs solvants*

Résultats

Les coefficients $E\ {}^{1\%}_{1\ cm}$ sont empruntés à Goodwin (1955) pour le néolycopène et nous avons attribué le même coefficient à la lycophylle. Les radioactivités spécifiques observées et les spectres des pigments purifiés sont consignés dans le tableau 9.

La pureté de tous ces pigments a été contrôlée par microchromatographie sur chromatoplaque d'acide silicique. Le β-carotène, qui n'a pas été soumis à ce contrôle, présente une forte radioactivité spécifique (163 000 c.p.m./mg) : sa pureté n'est pas établie.

IV. — Préparation de zéaxanthine ^{14}C a partir du calice de *Physalis franchetii*

Le calice qui entoure les baies de *Physalis* contiennent principalement du dipalmitate de zéaxanthine (Kuhn et Grundmann, 1933 et Cholnoky et Szabolcs, 1959). Afin de préparer de la zéaxanthine marquée au ^{14}C, nous avons utilisé les

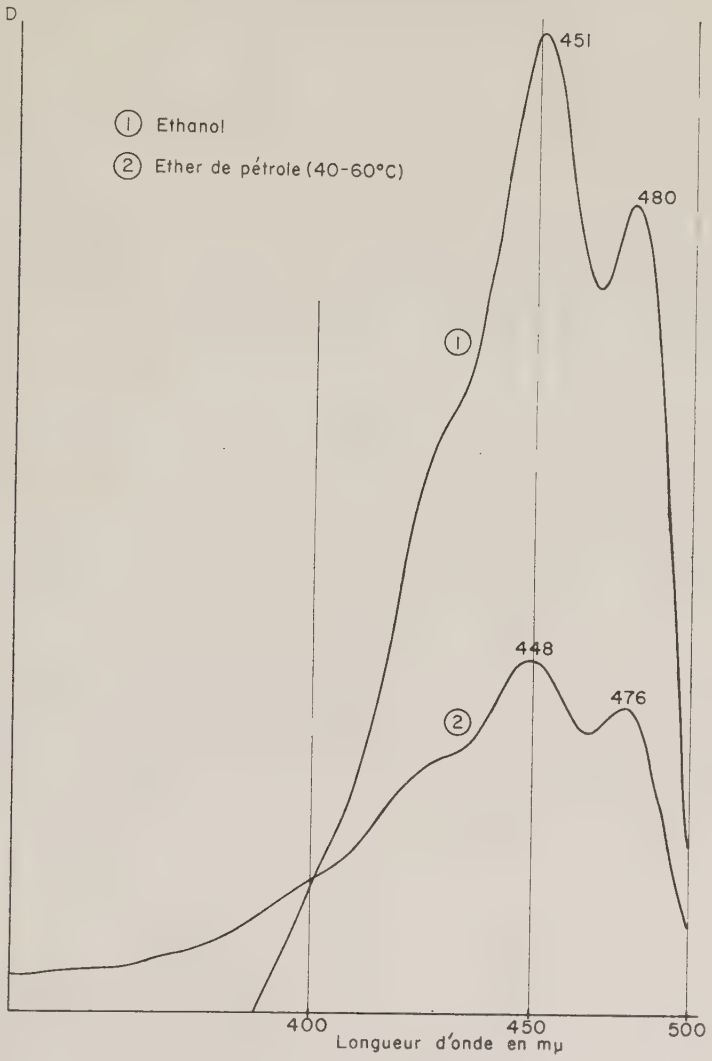


Fig. 29. — *Spectres d'absorption de la zéaxanthine-^{14}C extraite des calices de* Physalis franchetii, *infiltrés par de l'acétate-2-^{14}C de sodium*

fruits de *Physalis franchetii*. Ces plantes ont été semées au printemps (25 mars) en serre. Les premiers fruits sont apparus en été et leur maturation a commencé à la fin de septembre.

Pénétration de l'acétate radioactif dans le fruit

On prélève un fruit (poids total = 5,21 g) dont la base est déjà rouge, indiquant un début de maturation. On le met à flotter sur 21 ml de milieu nutritif contenant 50 µCi et 0,4 mg d'acétate 2-^{14}C de sodium. L'ensemble est placé dans la chambre à photosynthèse dans laquelle circule de l'air humide (2 l/mn). Au bout de 5 jours d'éclairement ininterrompu (5 000 lux) le calice devient rouge.

Extraction et saponification des pigments

Le calice (poids = 1,17 g) est détaché du fruit. Les pigments sont totalement extraits par broyage au mortier en présence de sable et du mélange

{ acétone 50 ml
{ éther de pétrole 50 ml

On ajoute à l'extrait 50 ml de KOH à 15 p. 100 dans le méthanol et l'on saponifie à reflux au bain marie à 50°C pendant 5 heures. Le mélange réactionnel est ensuite agité avec 300 ml d'éther de pétrole qui rassemblent les caroténoïdes. On débarrasse cette solution de l'acétone et du méthanol par lavage à l'eau.

Purification de la zéaxanthine par chromatographie

Une première chromatographie de cette solution sur poudre de cellulose (250 mm × 35 mm) permet d'isoler la zéaxanthine.

L'éther de pétrole élue le β-carotène et les esters de xanthophylle qui ont résisté à la saponification (A).

Le mélange éther de pétrole/acétone : 97/3 élue :

— une faible quantité d'un pigment jaune (λ_{max} : ~ 425 — 449 — 476 mµ). Il s'agit probablement de la cryptoxanthine (B_1) ;

— le principal pigment qui forme un anneau rose orangé (B_2).

Ce pigment B_2 est rechromatographié 2 fois sur cellulose. Le dernier éluat est évaporé à sec et repris dans un faible volume d'éther de pétrole contenant 3 p. 100 d'acétone. Cette solution est placée 2 jours à — 30°C à l'obscurité. La zéaxanthine cristallise en aiguilles agglomérées. Les cristaux, séparés par filtrage, sont abondamment lavés à l'éther de pétrole.

Les spectres d'absorption de ce pigment correspondent à ceux de la zéaxanthine (fig. 29) :

éther de pétrole :448 — 476 mµ
éthanol : 451 — 480 mµ

Par microchromatographie sur acide silicique ce pigment est inséparable de la zéaxanthine HOFFMAN-LAROCHE dans les deux systèmes de solvant suivants :

{ hexane 90
{ éther éthylique 10

et

{ éther de pétrole 10
{ benzène 2
{ éthanol 1 (EICHENBERGER et GROB, 1962 *a*)

Sur ces chromatoplaques, aucune impureté révélable par absorption UV, fluorescence ou réaction avec $KMnO_4$ n'a été décelée.

Déterminée par scintillation liquide, la radioactivité spécifique de la zéaxanthine est :

avant cristallisation :	81 300 c.p.m. par mg
après cristallisation :	84 100 c.p.m. par mg

Pendant la durée de l'expérience la radioactivité du CO_2 expiré par le fruit est de 1 954 000 c.p.m., soit 374 000 c.p.m. par g de fruit.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. Action de la lumière sur les teneurs en caroténoïdes dans les feuilles et dans les chloroplastes

Afin d'élucider certaines étapes du mécanisme de biosynthèse des caroténoïdes dans les feuilles nous avons utilisé des précurseurs radioactifs. Dans une première série d'expériences nous avons déterminé les meilleures conditions physiologiques pour incorporer les métabolites marqués.

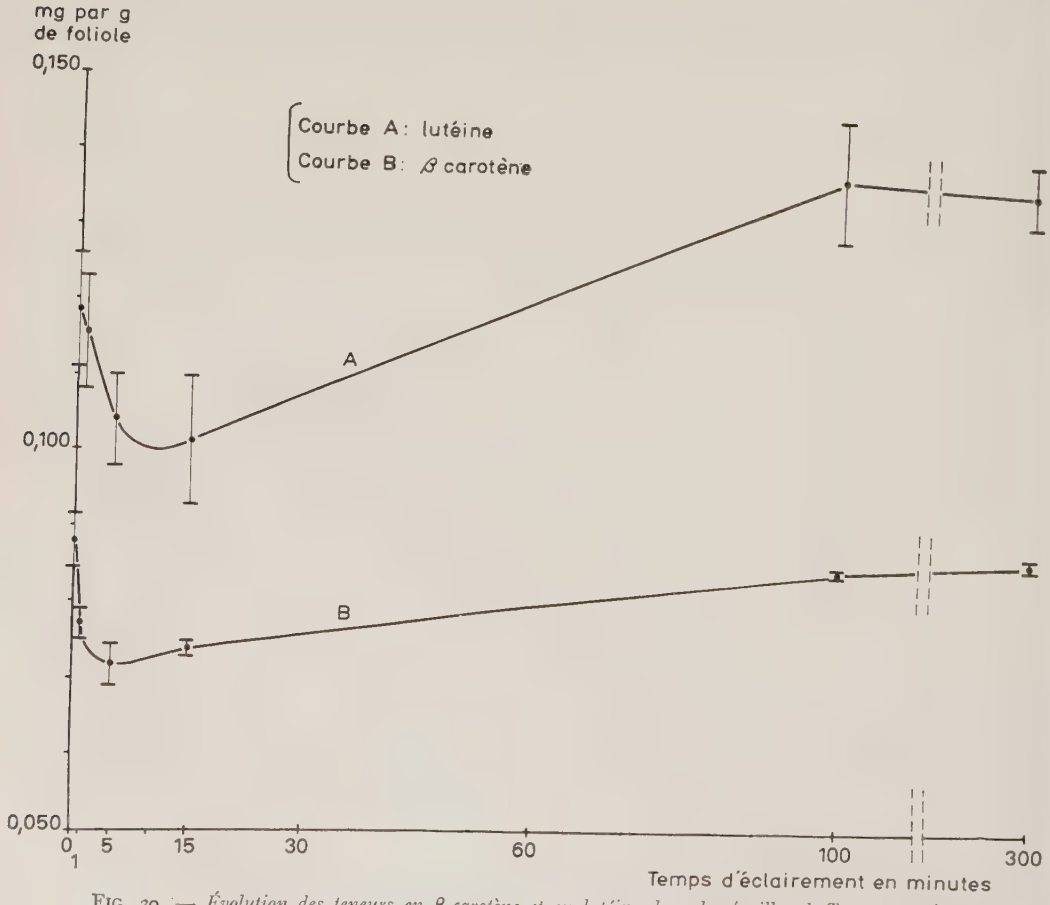


FIG. 30. — *Évolution des teneurs en β-carotène et en lutéine dans les feuilles de Tomates excisées, pendant un éclairement de faible intensité* (4 200 lux)

I. — Feuilles de tomate

Dans les folioles excisées de Tomate, flottant sur milieu nutritif, nous avons observé qu'après une longue période d'obscurité (15 heures), l'éclairement (4 200 lux) provoque une évolution rapide des teneurs en β-carotène et en lutéine. Ces teneurs sont calculées par rapport au poids de matière fraîche des folioles excisées, *mesuré avant la mise en expérience*. Les diminutions observées ne peuvent donc pas être attribuées à des variations dans le poids de matière sèche ou de matière fraîche au cours de l'éclairement : exprimées de cette façon les variations des quantités et des

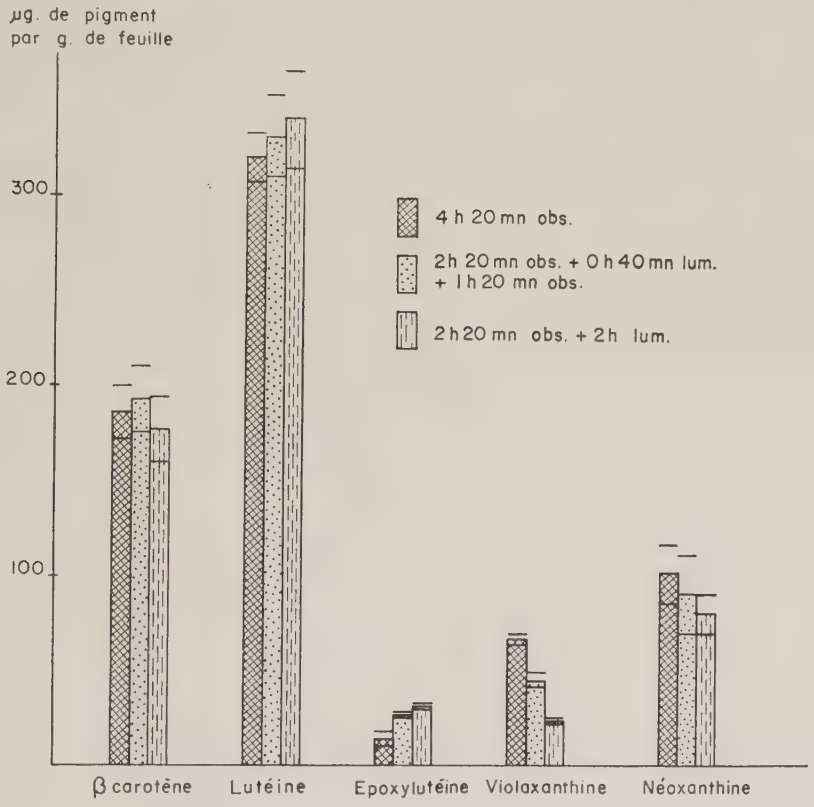


Fig. 31. — *Action d'une lumière de forte intensité* (23 000 lux) *sur les teneurs en caroténoïde dans les feuilles de Tomate excisées*

teneurs en pigments évoluent parallèlement. Les courbes de la figure 30 montrent d'abord une phase de destruction des pigments, *plus rapide pour le β-carotène* (— 18 p. 100 de la masse initiale en 5 minutes) *que pour la lutéine* (— 11 p. 100 de la masse initiale en 15 minutes). Il y a ensuite une phase de resynthèse tendant à rétablir les quantités initiales de pigments, qui se stabilisent au bout d'environ 2 heures.

Dans une autre série d'expériences nous avons examiné la réaction de tous les caroténoïdes à une lumière plus intense (23 000 lux) après une période d'obscurité. Les résultats sont représentés par les diagrammes de la figure 31. Nous y voyons que :

— par rapport à l'obscurité, l'action globale de la lumière pendant 2 heures

ne semble entraîner aucune variation significative des teneurs en β-carotène, en lutéine et en néoxanthine. Nous avons vu, qu'en réalité il y destruction, puis synthèse de β-carotène et de lutéine pendant cette période ;

— au bout de 2 heures d'éclairement la teneur en époxylutéine a augmenté (226 p. 100) et celle de la violaxanthine a diminué (35 p. 100). L'ampleur de ces variations est liée à la durée de l'éclairement.

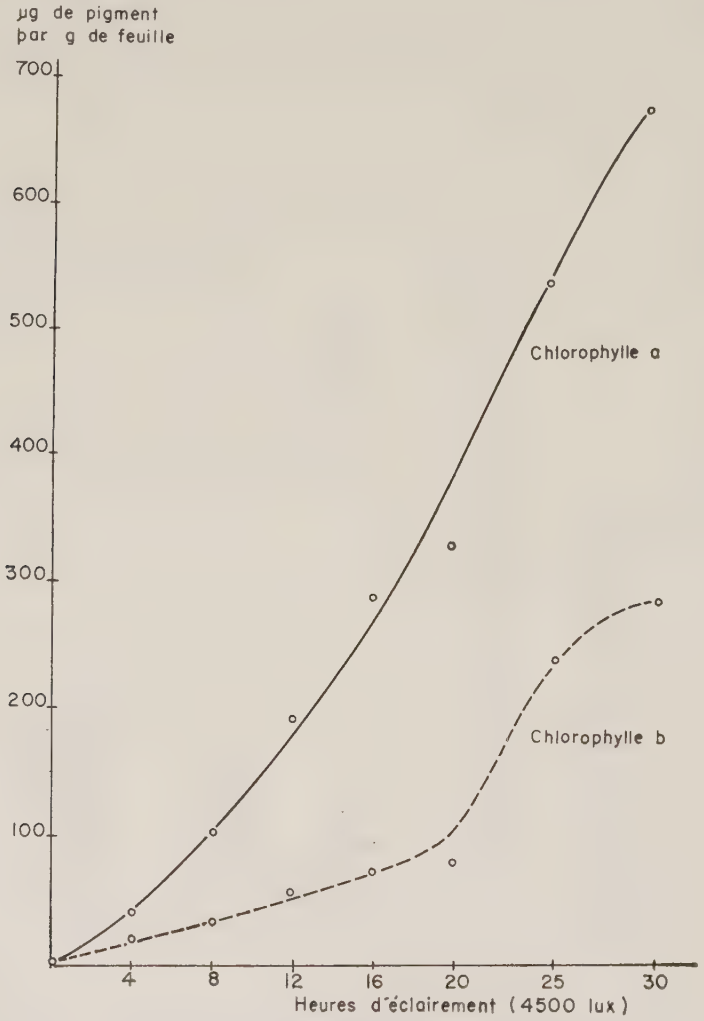


FIG. 32. — *Biosynthèse des chlorophylles sous l'action de la lumière* (4 500 lux) *chez les feuilles de Maïs étiolées* (14 jours).

Il apparaît que dans les feuilles adultes de Tomate en survie, *la lumière permet une synthèse du β-carotène et de la lutéine et stabilise leurs teneurs, qu'elle entraîne une forte synthèse d'époxylutéine et une forte dégradation de la violaxanthine.* Cette période de 2 heures où nous avons décelé une grande réactivité des pigments à la lumière nous a semblé la plus propice à l'incorporation de précurseurs radioactifs.

II. — Jeunes feuilles étiolées de maïs

Il est bien connu que les plantules étiolées verdissent à la lumière. Dans le cas du Maïs, pour un éclairement moyen de 4 500 lux au niveau des feuilles excisées plongeant dans une solution contenant du *Tween* 80, nous avons vérifié que :

— la teneur en chlorophylle *a* augmente plus rapidement que celle de la chlorophylle *b* (fig. 32) ;

— les synthèses du β-carotène et de l'époxylutéine sont presque aussi rapides que celle de la chlorophylle *a* : leur vitesse augmente dès le début de l'éclairement (fig. 33) ;

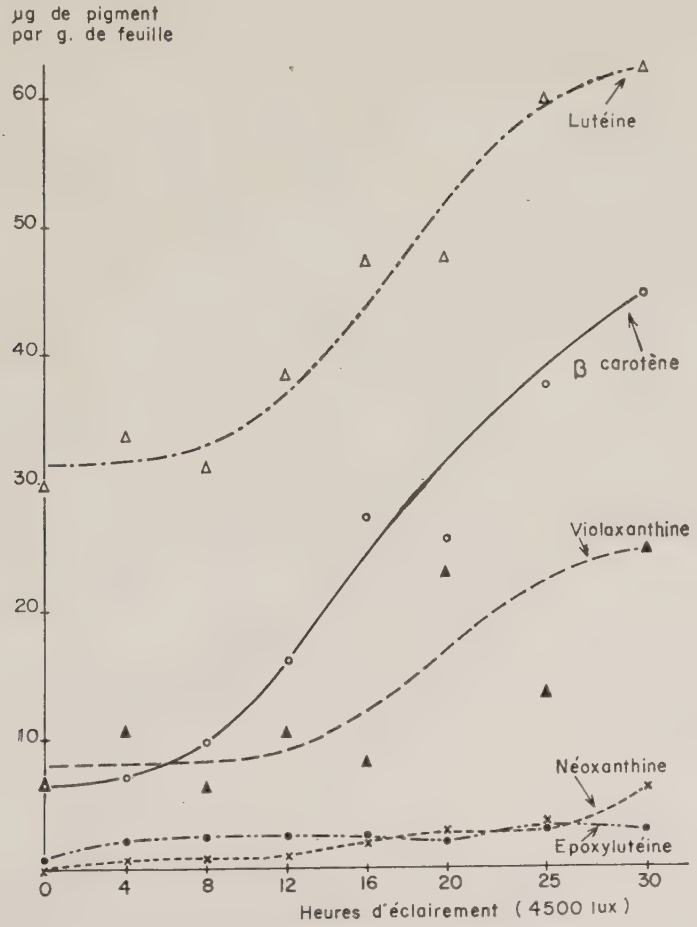


Fig. 33. — *Biosynthèse des caroténoïdes sous l'action de la lumière* (4 500 lux) *chez les feuilles de Maïs étiolées* (14 jours)

— les teneurs en lutéine, en violaxanthine et en néoxanthine ne commencent à augmenter qu'au bout d'environ 12 heures d'éclairement (fig. 33).

Nous voyons qu'en 30 heures nous assistons à une biosynthèse active de chlorophylle et accélérée pour le β-carotène (× 7). C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé les feuilles étiolées de Maïs pour comparer la biosynthèse du phytol à celle

des caroténoïdes. Nous devons noter que dans ces conditions, la masse de chlorophylle apparue est 25 fois plus grande que celle du β-carotène et 30 fois plus grande que celle de la lutéine nouvellement synthétisée. Cela signifie que la synthèse apparente de chlorophylle totale est de 15 molécules pour 1 molécule de β-carotène et de 18 molécules pour 1 molécule de lutéine.

III. — Chloroplastes isolés

Dans les chloroplastes isolés, en milieu tamponné (pH 7,1) les teneurs en pigments diminuent à la température de 20°C : nous n'avons jamais observé de synthèse de caroténoïdes se traduisant par une accumulation mesurable de pigments.

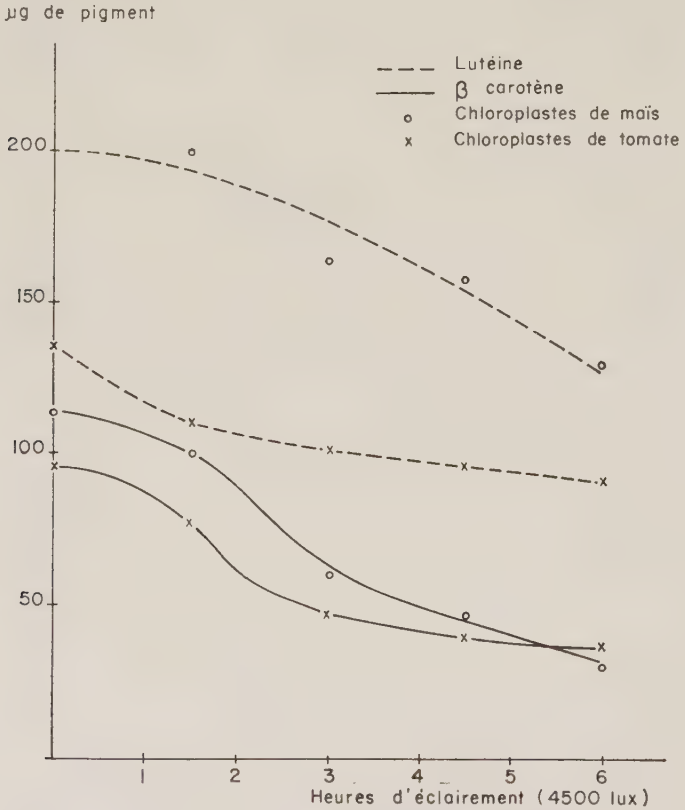


Fig. 34. — *Destruction à la lumière, du β-carotène et de la lutéine dans les chloroplastes isolés de feuilles de Maïs et de Tomate (milieu pH 7,1)*
(en ordonnées, µg de pigments dans le mélange réactionnel)

Les courbes de la figure 34 montrent qu'à la lumière le β-carotène est plus fortement détruit que la lutéine : au bout de 6 heures d'un faible éclairement, il reste 65 p. 100 de lutéine et seulement 26 p. 100 de carotène dans les chloroplastes isolés des feuilles de Maïs.

Plusieurs auteurs ont décrit un système enzymatique qui détruit le β carotène dans les chloroplastes isolés (Friend et Mayer, 1960) ou dans les broyats de feuille

(Booth, 1960). Dans les dégradations que nous avons observées, nous avons voulu connaître dans la mesure du possible, la part de la destruction enzymatique et celle de la destruction photochimique. Les résultats du tableau 10 montrent que la lutéine est surtout sensible à la lumière alors que la dégradation du β-carotène est à la fois enzymatique (à l'obscurité) et photochimique. Cela a été confirmé sur des chloroplastes de feuilles de Tomate : au bout de 5 heures d'éclairement, la teneur en β-carotène diminue plus fortement dans la suspension de chloroplastes actifs que dans la suspension de chloroplastes dénaturés par la chaleur, alors que la teneur en lutéine est la même dans les deux cas (tabl. 11).

TABLEAU 10

Destruction des caroténoïdes dans les chloroplastes de Maïs à la lumière et à l'obscurité
(masse en µg dans 20 ml de suspension — pH 7,1 — 4 500 lux)

	Temps (h)	Obscurité		Lumière	
		µg	%	µg	%
β-carotène	5	135	*100*	79	*100*
	12	101	*75*	41	*52*
Lutéine	5	193	*100*	168	*100*
	12	191	*100*	148	*88*

TABLEAU 11

Destruction photochimique et enzymatique des caroténoïdes dans les chloroplastes de Tomate
(quantités en µg dans 10 ml de suspension-pH 7,1).

	Quantités initiales		Quantités après 5 h d'éclairement (4 500 lux)			
			Chloroplastes actifs		Chloroplastes dénaturés (10 mn à 90°C)	
	µg	%	µg	%	µg	%
β-carotène	20	*100*	9	*45*	14	*70*
Lutéine	27	*100*	23	*85*	22	*82*

Il nous apparaît que *dans les chloroplastes isolés comme dans les limbes de Tomate, la fragilité du β-carotène à la lumière est plus grande que celle de la lutéine même pour un éclairement de faible intensité.* Nous confirmons ainsi les observations des auteurs qui ont décrit le β-carotène comme le plus fragile des pigments chloroplastiques à la lumière (Sironval et Kandler, 1958). Et nous voyons qu'il est préférable de ne pas dépasser 10 heures d'éclairement dans les expériences d'incubation de précurseurs marqués avec des chloroplastes isolés.

Ayant ainsi défini les conséquences physiologiques de l'action de la lumière sur la répartition des principaux pigments chloroplastiques, nous allons utiliser les fragments de limbe de Tomate pour les expériences sur la feuille adulte. En effet la feuille de Tomate est un matériel génétiquement plus homogène que la feuille de Maïs : nous utiliserons seulement les feuilles étiolées de Maïs à cause de l'intense synthèse de chlorophylle qu'on y observe lors de l'éclairement.

B. Biosynthèse du phytol des chlorophylles et du squelette tétraterpénique des caroténoïdes

Comme nous l'ont suggéré les travaux antérieurs, le β-carotène paraît plus rapidement synthétisé dans les feuilles que tous les autres pigments des chloroplastes. Nous avons voulu nous assurer de ce fait en incorporant dans les feuilles des substances marquées au ^{14}C, situées au carrefour de plusieurs métabolismes (CO_2, acétate, mévalonate) et en mesurant la vitesse de synthèse de chaque pigment par sa radioactivité spécifique.

I. — Role précurseur du CO_2, de l'acide acétique et de l'acide mévalonique

Biosynthèse des pigments à partir de $^{14}CO_2$ dans les feuilles de Tomate

Dans une première expérience, nous avons voulu comparer les vitesses de synthèse des caroténoïdes et des chlorophylles dans des feuilles vertes. Après 2 heures

TABLEAU 12

Incorporation de $^{14}CO_2$ dans les pigments de la feuille de Tomate

Tomates âgées de 2 mois = 5 folioles terminales prélevées sur les 3e feuilles. (poids frais : 406 mg) $^{14}CO_2$: 150 μCi — 0,26 p. 1 000 dans l'air. Lumière blanche : 15 000 lux — 2 heures.

Pigments	Teneurs en mg/g de poids frais	Radioactivités spécifiques (en c.p.m./mg de pigment)	Radioactivités incorporées (en c.p.m./g de foliole)	Proportion de la radioactivité totale incorporée (%)	Teneurs en % du poids sec
β-carotène	0,128	207 000	26 600	*1,4*	0,07
Lutéine	0,133	27 200	3 630	*0,2*	0,07
Zéaxanthine	0,039	30 300	1 180		
Époxylutéine	0,013	95 000	1 245		
Violaxanthine + Auroxanthine (Teneurs exprimées en violaxanthine)	0,013	—	1 320		
Néoxanthine	0,029	10 800	312		
Total des caroténoïdes	0,355	—	34 287	*1,87*	0,19
Chlorophylle *a*	1,53	1 020	1 560	*0,08*	0,85
Chlorophylle *b*	0,96	0	0	*0*	0,53
Total des chlorophylles	2,49	—	1 560	*0,08*	1,38
Radioactivité fixée totale			1 834 600	*100*	

d'obscurité, les limbes sont exposés pendant 2 heures à un éclairement de 15 000 lux (lumière blanche) en présence de $^{14}CO_2$: les résultats sont consignés dans le tableau 12. Nous voyons apparaître les faits suivants :

— *Les caroténoïdes sont bien plus rapidement renouvelés que les chlorophylles.* En effet, au bout de 2 heures d'éclairement 1,87 p. 100 de la radioactivité totale venant du $^{14}CO_2$ se retrouve dans les caroténoïdes et seulement 0,08 p. 100 dans les

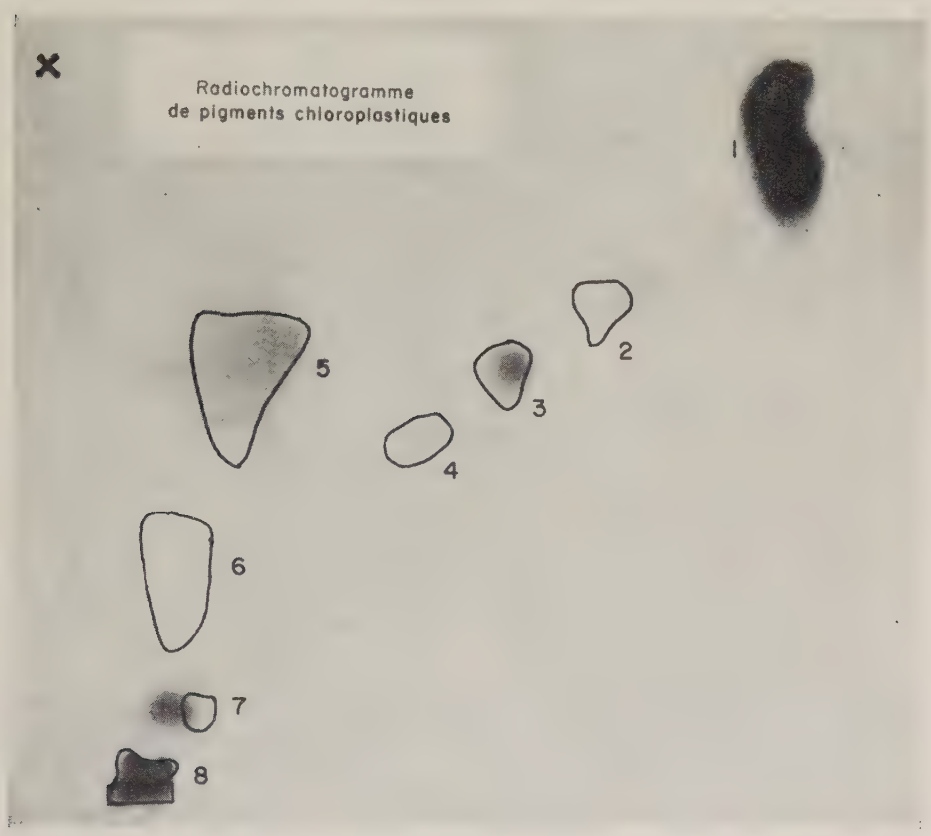


FIG. 35. — *Incorporation de $^{14}CO_2$ dans les pigments de la feuille de Tomate après deux heures de photosynthèse*

1 β-carotène et impuretés liposolubles
2 Phéophytine *a*
3 Lutéine
4 Violaxanthine
5 Chlorophylle *a*
6 Chlorophylle *b*
7 Néoxanthine
8 Tache initiale

chlorophylles. Or la masse des caroténoïdes ne représente environ que 0,19 p. 100 de la matière sèche des limbes foliaires alors que les chlorophylles en représentent 1,38 p. 100. Cela signifie que pour 1 atome de carbone radioactif dans les chlorophylles il y a à peu près 160 atomes de ^{14}C dans les caroténoïdes, dans cette expérience.

— *La chlorophylle* a *est plus rapidement synthétisée que la chlorophylle* b car aucune

TABLEAU 13

Incorporation de $^{14}CO_2$ dans les caroténoïdes de la feuille de Tomate

Tomates âgées de 2 mois 1/2 = 5 folioles terminales prélevées sur les 4e et 5e feuilles Matière sèche = 12 %. $^{14}CO_2$: 150 µCi — 0,21 p. 1 000 dans l'air. Lumière blanche : 2 heures. Température : 25° à 27°C.

Pigments	Intensité lumineuse : 23 000 lux				Intensité lumineuse : 36 000 lux			
	Teneurs en µg/g de foliole	Radioactivités spécifiques (c.p.m./µg de pigment)	Radioactivités incorporées		Teneurs en µg/g de foliole	Radioactivités spécifiques (c.p.m./µg de pigment)	Radioactivités incorporées	
			c.p.m./g de foliole	% de ^{14}C incorporé			c.p.m./g de foliole	% de ^{14}C incorporé
β-carotène	165	2 350	388 000	*0,97*	152	2 605	396 000	*1,03*
Lutéine	198	425	84 200	*0,21*	168	354	59 500	*0.15*
Epoxylutéine	15	850	12 750		20,5	810	16 600	
Violaxanthine + Auroxanthine (Teneurs exprimées en violaxanthine)	15,6	720	8 800		9,1	800	8 240	
Néoxanthine	22,7	112,6	2 560		17,4	262	4 570	
Total des caroténoïdes	416,3		496 310	*1,24*	367		484 910	*1,26*
Radioactivité fixée totale			39 898 400	*100*			38 526 900	*100*

radioactivité n'est décelable dans la chlorophylle *b* au bout de 2 heures d'éclairement. Ce fait apparaît également sur l'autoradiogramme de chromatographie des pigments (fig. 35). Nous confirmons pleinement les résultats de Roux et Husson (1952) et de Shlyk et Godnev (1958), en accord avec les faits récents qui semblent montrer que la chlorophylle *a* est le précurseur direct de la chlorophylle *b* (Godnev et *al.*, 1960).

— *La vitesse d'intégration du ^{14}C dans le β-carotène est bien plus grande que dans les xanthophylles.* La radioactivité incorporée dans le β-carotène est environ 7 fois plus grande que celle fixée dans la lutéine qui, elle-même, rassemble la plus grande partie de la radioactivité des xanthophylles. Or les masses du β-carotène et de la lutéine représentent sensiblement la même proportion de la matière sèche (0,07 p. 100). Le β-carotène paraît donc plus rapidement renouvelé que les xanthophylles à la lumière. Ce résultat obtenu avec du β-carotène purifié confirme les travaux antérieurs.

Afin de préciser cette différence, nous avons répété ce type d'expérience avec des éclairements plus intenses : 23 000 lux et 36 000 lux. Dans ces expériences, nous n'avons pas trouvé de zéaxanthine en quantité suffisante pour la caractériser. Deux faits apparaissent nettement à l'examen des résultats du tableau 13.

— A partir de $^{14}CO_2$, le β-carotène est le plus marqué de tous les caroténoïdes à la lumière. Sa radioactivité spécifique est supérieure à celle de la lutéine et nous avons vérifié que si le temps d'éclairement augmente, le rapport de la radioactivité spécifique du β-carotène à celle de la lutéine diminue :

Durée d'éclairement (23 000 lux)	1 heure	2 heures
Radioactivités spécifiques : $\frac{\beta\text{-carotène}}{\text{lutéine}}$ ...	27,6	5,5
Radioactivités incorporées : $\frac{\beta\text{-carotène}}{\text{lutéine}}$ ...	10,2	4,6

— De toutes les xanthophylles identifiées, ce sont les époxydes, époxylutéine et violaxanthine qui ont la plus forte radioactivité spécifique, bien que 3 fois plus faible environ que celle du β-carotène.

L'ensemble de ces faits confirme le caractère particulier du β-carotène parmi les pigments chloroplastiques. Nous avons de plus observé que, dans les chloroplastes, la chaîne carbonée des caroténoïdes est soumise à un renouvellement plus rapide que celui des chlorophylles. Cela permet de supposer une association de ces pigments au mécanisme de la photosynthèse. Il est alors intéressant de se demander pourquoi des substances de structure aussi voisines que le β-carotène et la lutéine ont des vitesses de renouvellement très différentes : y-a-t-il deux voies de biosynthèse parallèles, l'une conduisant au β-carotène, l'autre à la lutéine? Ou bien y-a-t-il une voie commune avec disjonction à partir d'un métabolite « carrefour »? Parmi les substances situées au carrefour de plusieurs métabolismes, nous avons choisi l'acide acétique et l'acide mévalonique. Ce dernier est plus engagé que l'acide acétique car il est déjà connu comme un précurseur de tous les composés terpéniques. Mais nous voulons savoir si les différences observées entre β-carotène et xanthophylles à partir de CO_2 se maintiennent avec ces deux précurseurs plus élaborés que le CO_2.

TABLEAU 14

Incorporation d'acétate 2-^{14}C dans les caroténoïdes de la feuille de Tomate

Tomates agées de 4 mois : 1ere et 2e feuilles (folioles terminales)

Poids frais { obscurité : 701 mg / lumière : 662 mg — Matière sèche : 15 %

$^{14}CH_3COO$ Na (368 µg et 40 µCi dans 50 ml) : 7,35 µg et 0,8 µCi par ml de solution

Durée des infiltrations : 7 heures — Températures = 26 — 28 °C

Pigments	Lumière : 36 000 lux					Obscurité				
	Teneurs en µg/g de foliole	Radioactivités spécifiques en c.p.m./µg de pigment	Radioactivités incorporées			Teneurs en µg/g de foliole	Radioactivités spécifiques en c.p.m./µg de pigment	Radioactivités incorporées		
			en c.p.m./g de foliole	en % des caroténoïdes	en % de l'insaponifiable			en c.p.m./g de foliole	en % des caroténoïdes	en % de l'insaponifiable
β-carotène	15	296	4 460	*76,2*	*25*	114	29,1	3 310	*94,4*	*14,6*
Lutéine	92	6,5	598	*10,3*	*3,3*	301	0	0	*0*	
Epoxylutéine	12	12,7	152	*2,6*		14	0	0	*0*	
Auroxanthine + Violaxanthine (Teneurs exprimées en violaxanthine)	4	—	536	*9*	*3*	68	—	196	*5,6*	*0,9*
Néoxanthine	8,4	13,6	114	*1,9*		91	0	0	*0*	
Total des caroténoïdes	131,4		5 860	*100*	*33*	588		3 506	*100*	*15,5*
Insaponifiable			17 800		*100*			22 700		*100*

Biosynthèse des caroténoïdes à partir de CH_3—COO^-

Feuilles de Tomate.

Nous avons d'abord laissé pénétrer l'acétate-2-^{14}C de sodium dans les limbes foliaires de Tomate à la lumière et à l'obscurité pendant 7 heures selon la technique de Bandurski (1949) : les folioles excisées flottent sur le milieu nutritif.

Le tableau 14 rassemble les résultats qui nous montrent que :

— à la lumière, tous les caroténoïdes sont marqués après une période 7 heures d'incorporation de $^{14}CH_3$—COO$^-$. La radioactivité incorporée dans le β-carotène est 7,4 fois plus grande que celle de la lutéine ;

— à l'obscurité, seuls le β-carotène et la violaxanthine sont radioactifs après 7 heures d'infiltration continue. La lutéine ne semble pas marquée ;

— la radioactivité totale fixée dans l'insaponifiable augmente à l'obscurité : elle passe de 17 800 c.p.m. à la lumière à 22 700 c.p.m. à l'obscurité, alors que la radioactivité diminue dans les caroténoïdes, passant de 5 860 c.p.m. à 3 500 c.p.m. Ce fait suggère une synthèse préférentielle des stérols dans les feuilles à l'obscurité.

TABLEAU 15

Incorporation d'acétate-2-^{14}C dans les caroténoïdes de la feuille de Tomate à l'obscurité
Tomates âgées de 3 mois : 3^e feuilles (folioles terminales)
Poids frais : 1,02 g. Matière sèche = 16 p. 100
$^{14}CH_3$-COONa (50 μCi) : 1 μCi par ml de solution.
Durée d'infiltration : 16 heures.

Pigments	Teneurs en μg/g de foliole	Radioactivités spécifiques en c.p.m./μg de pigment	Radioactivités incorporées		
			en c.p.m./g de foliole	en % des caroténoïdes	en % de l'insaponifiable
β-carotène	120	255	30 600	*58,1*	*22,7*
Lutéine	183	47,4	8 660	*16,5*	*6,4*
Époxylutéine	8,5	145,5	1 245	*2,4*	*0,9*
Violaxanthine	53	183	9 695	*18,5*	*7,2*
Néoxanthine	47	49,6	2 350	*4,5*	*1,8*
Total des caroténoïdes	411,5		52 550	*100*	*39*
Insaponifiable			134 850		*100*
CO_2 respiré			4 090		

Afin de nous assurer de l'ordre dans lequel les caroténoïdes sont synthétisés à l'obscurité, nous avons augmenté la durée d'incorporations de l'acétate radioactif jusqu'à 16 heures. A l'examen des résultats figurant dans le tableau 15, il apparaît que tous les caroténoïdes peuvent être synthétisés à l'obscurité dans les feuilles à partir de l'acétate. Il est confirmé que le β-carotène et la violaxanthine sont formés les plus rapidement : dans cette expérience, ces deux pigments ont des radioactivités

TABLEAU 16

Incorporation d'acétate-2-^{14}C dans les caroténoïdes des plantules étiolées de Maïs verdissant à la lumière (deux essais : 1 et 2)

Plantules de 14 jours. 1res feuilles (3). Poids frais $\begin{cases} m_1 = 0{,}404 \text{ g} \\ m_2 = 0{,}352 \text{ g} \end{cases}$

$^{14}CH_3$—COONa : 44 µg et 5 µCi par essai. Infiltration complète dans les feuilles (*Tween* 80, 0,5 p. 1000). Éclairement : 4 500 lux pendant 30 heures.

Pigments		Teneurs en µg/g de foliole	Radioactivités spécifiques en c.p.m./µg de pigment	Radioactivités incorporées (en c.p.m./g de foliole)	Radioactivités incorporées en % des caroténoïdes	Radioactivités incorporées en % de l'insaponifiable	Radioactivités incorporées en % de la radioactivité totale incorporée
β-carotène	1	26,6	375	10 000	67	9,9	*0,90*
	2	29,8	397	11 820	72,4	6,2	*0,72*
Lutéine	1	43,9	57,2	2 510	16,9	2,5	*0,22*
	2	39	79,5	3 100	19	1,7	*0,19*
Époxylutéine	1	4,6		1 485	9,9		
	2	3,7		507	3,2		
Violaxanthine + Auroxanthine (teneurs exprimées en violaxanthine)	1	21,2		546	3,7		
	2	15,6		667	4,1		
Néoxanthine	1	5	75	380	2,5		
	2	2,3	93	214	1,3		
Total des caroténoïdes	1	101,3		14 921	100	14,7	*1,34*
	2	90,4		16 308	100	8,6	*1*
Insaponifiable	1			101 480		100	*9,15*
	2			189 070		100	*11,6*
Radioactivité totale incorporée				1 107 680			*100*
				1 630 570			*100*

spécifiques voisines, à l'obscurité. La lutéine et la néoxanthine sont formées plus tard.

Ces résultats montrent que dans une feuille verte :

— *l'acétate est un précurseur du β-carotène et des xanthophylles. On retrouve la même différence entre leurs vitesses de synthèse que si le CO_2 est le précurseur ;*

— *la lumière n'est pas indispensable à la caroténogenèse : elle la favorise.*

Feuilles étiolées de Maïs verdissant à la lumière.

Après la pénétration complète de la solution d'acétate -2-^{14}C de sodium en présence de *Tween* 80 les plantules étiolées utilisent cet acétate pour synthétiser leurs caroténoïdes lors du verdissement. C'est ce qui ressort des résultats du tableau 16 : environ 1 p. 100 de la radioactivité totale infiltrée se retrouve dans les caroténoïdes qui rassemblent à peu près 11 p. 100 de la radioactivité de l'insaponifiable.

Dans ces jeunes feuilles verdissant, nous retrouvons le même phénomène que dans les feuilles adultes : la vitesse de synthèse du β-carotène, mesurée par sa radioactivité spécifique, est environ 6 fois plus grande que celle de la lutéine. En effet pour plusieurs expériences nous avons trouvé les résultats suivants :

		Radioactivités spécifiques	Radioactivités incorporées
Rapports	$\frac{\beta\text{-carotène}}{\text{lutéine}}$	6,5 — 5 — 7,1 — 5,9	3,9 — 3,8 — 4,3 — 3,1

Or, nous avons vu que dans ces conditions, il apparaît à la lumière à peu près le même nombre de molécules de β-carotène (0,07 µmole) que de lutéine (0,06 µmole) par g de feuille : c'est donc la vitesse de renouvellement du β-carotène qui est plus élevée que celle de la lutéine, même dans les feuilles jeunes.

Biosynthèse des caroténoïdes à partir d'acide mévalonique

Feuilles de Tomate.

Avec la même technique que pour l'acétate, nous avons obtenu des résultats analogues (tabl. 17) :

— tous les caroténoïdes peuvent être synthétisés à partir de l'acide DL-mévalonique.

— le β-carotène est plus marqué que les xanthophylles à la lumière.

— parmi les xanthophylles ce sont la violaxanthine et l'époxylutéine qui ont les plus fortes radioactivités spécifiques.

Feuilles étiolées de Maïs verdissant à la lumière.

De même que l'acétate, les plantules de Maïs étiolées utilisent le DL-mévalonate pour la biosynthèse des caroténoïdes (tabl. 18). Mais les résultats expérimentaux appellent deux remarques :

— le rendement d'utilisation du mévalonate paraît moins élevé que celui de l'acétate : en effet on ne retrouve dans les caroténoïdes que 0,3 p. 100 de la radioactivité totale infiltrée alors qu'à partir de l'acétate on en retrouvait environ 1 p. 100. De plus, la proportion de radioactivité de l'insaponifiable qui correspond aux caroténoïdes est à pue près 10 fois plus petite à partir du mévalonate (1,2 p. 100) qu'à

partir de l'acétate (11 p. 100) et l'insaponifiable rassemble plus de radioactivité provenant du mévalonate (24 p. 100) que de l'acétate (10 p. 100). Cette observation rejoint celles que GOODWIN (1963) a interprétées par le fait que l'acide mévalonique peut difficilement pénétrer dans la structure des chloroplastes : ce métabolite est utilisé préférentiellement dans le cytoplasme à la synthèse des stérols. Et le rendement est encore abaissé par l'*excès* d'acide mévalonique radioactif introduit artificiellement dans les feuilles, qui ne réagit pas, et que l'on retrouve dans l'extrait hydroacétonique.

TABLEAU 17

Incorporation de DL-*mévalonate-2-*^{14}C *à la lumière dans les caroténoïdes de la feuille de Tomate*

Tomates âgées de 2 mois : 3e feuilles (folioles terminales) { poids frais = 1,032 g ; matière sèche = 12 %.
Mévalonate de potassium : 0,55 µCi par ml de solution. *Tween* 80 : 0,5 °/oo
Éclairement : 45 000 lux pendant 6 heures; t = 24°-26°C.

Pigments	Teneurs en µg/g de foliole	Radioactivités spécifiques (c.p.m./µg de pigment)	Radioactivités incorporées		
			c.p.m./g de foliole	en % des caroténoïdes	en % de l'insaponifiable
β-carotène	118	113	13 300	*78,6*	*12,7*
Lutéine	182	11,6	2 110	*12,5*	*2*
Époxylutéine	12,6	37,5	475	*2,8*	
Violaxanthine	34,2	15,7	540	*3,2*	
Néoxanthine	52,2	9,5	497	*2,9*	
Total des caroténoïdes	399,1		16 922	100	*16,1*
Insaponifiable			104 920		*100*

— le β-carotène a la plus grande radioactivité spécifique. Mais la différence avec celle de la lutéine est moins grande qu'à partir du CO_2 ou de l'acétate :

		Radioactivités spécifiques	Radioactivités incorporées
Rapports	$\frac{\text{β-carotène}}{\text{lutéine}}$	3 — 3,3	1,9 — 2,5

II. — RÔLE DU GÉRANYLGÉRANIOL ET DU GÉRANYLLINALOOL

A partir de plusieurs substances « clé » du métabolisme (en C_1, C_2 et C_6) nous avons observé des différences importantes entre la vitesse de biosynthèse du β-carotène et celle des xanthophylles. Nous avons alors essayé, comme précurseurs, deux alcools diterpéniques : le géranylgéraniol et son isomère, le géranyllinalool, alcool tertiaire. Ces alcools pouvant être des précurseurs du phytol, nous avons étudié, en plus du β-carotène et de la lutéine, le phytol des chlorophylles *a* et *b*. Toute l'étude expérimentale que nous allons décrire maintenant a été conduite sur des plantules étiolées de Maïs verdissant à la lumière, de façon à profiter d'une forte synthèse de phytol chlorophyllien, contemporaine d'une synthèse de caroténoïdes.

TABLEAU 18

Incorporation de DL-mévalonate-2-^{14}C dans les caroténoïdes des plantules étiolées de Maïs verdissant à la lumière (deux essais 1 et 2)

Plantules de 14 jours. 1res feuilles (5). Poids frais $\begin{cases} m_1 = 0{,}298 \text{ g} \\ m_2 = 0{,}333 \text{ g} \end{cases}$
Mévalonate-2-^{14}C de potassium : 1,97 mg et 10 µCi par essai.
Infiltration complète dans les feuilles (*Tween* 80).
Éclairement : 4 500 lux pendant 30 heures.

Pigments		Teneurs en µg/g de foliole	Radioactivités spécifiques en c.p.m./µg de pigment	Radioactivités incorporées en c.p.m./g de foliole	Radioactivités incorporées en % des caroténoïdes 1	Radioactivités incorporées en % des caroténoïdes 2	Radioactivités incorporées en % de l'insaponifiable 1	Radioactivités incorporées en % de l'insaponifiable 2	Radioactivités incorporées en % de la radioactivité totale incorporée 1	Radioactivités incorporées en % de la radioactivité totale incorporée 2
β-carotène	1	22,2	1 440	32 000	60		0,75		*0,18*	
	2	20,1	1 755	35 400		65,9		0,80		*0,19*
Lutéine	1	35	467	16 350	30,8		0,38			
	2	26	538	14 000		26,1		0,31		
Époxylutéine	1	2,9		2 000	3,7					
	2	2,9	686	1 990		3,7				
Violaxanthine	1	14,4		1 930	3,6					
	2	5,4	270	1 460		2,7				
Néoxanthine	1	0,9		970	1,9					
	2	0,9		862		1,6				
Total des caroténoïdes	1	75,4		53 250	100		1,24		*0,30*	
	2	55,2		53 712		100		1,21		*0,29*
Insaponifiable	1			4 290 000			100		*24,4*	
	2			4 430 000				100		*24,2*
Radioactivité totale incorporée	1			17 520 000					*100*	
	2			18 350 000						*100*
CO_2 respiré	1			12 900						
	2			13 300						

Expériences de compétition métabolique entre un précurseur radioactif et les alcools diterpéniques (COSTES, 1962)

Au début de ce travail nous ne disposions pas de ces alcools marqués au ^{14}C ou au ^{3}H : nous avons fait des expériences de compétition métabolique entre un précurseur reconnu, radioactif (acétate ou mévalonate marqués au ^{14}C) et le précurseur éventuel, non marqué (alcool diterpénique). Si les alcools diterpéniques mis en com-

TABLEAU 19

Action de l'isophytol et du phytol sur l'incorporation d'acétate-2-^{14}C de sodium dans le β-carotène et dans la lutéine (feuilles de Maïs)

Expériences n°		Teneurs en pigment mg/g de feuille		Radioactivités spécifiques (c.p.m./mg de pigment)			Radioactivités incorporées (c.p.m./g de feuille)		
		mesures	moyennes	mesures	moyennes	%	mesures	moyennes	%
β-carotène									
Témoins	1	0,0286		82 500			2 360		
	2	0,0281		50 900			1 435		
	3	0,0303	0,0290	82 050	71 816	*100*	2 490	2 095	*100*
+ Isophytol	4	0,0278		90 000			2 530		
	5	0,0251		42 000			1 055		
	6	0,0208	0,0245	145 750	92 850	*129*	3 030	2 205	*105*
+ Phytol	7	0,0265		73 800			1 955		
	8	0,0241		102 300			2 465		
	9	0,0218	0,0241	64 200	80 243	*112*	1 400	1 940	*93*
Lutéine									
Témoins	1	0,0376		14 175			533		
	2	0,0387		14 025			543		
	3	0,0424	0,0395	21 325	16 508	*100*	905	660	*100*
+ Isophytol	4	0,0284		17 805			506		
	5	0,0376		19 355			729		
	6	0,0328	0,0329	20 225	19 128	*116*	664	633	*96*
+ Phytol	7	0,0412		16 025			660		
	8	0,0426		19 900			848		
	9	0,0325	0,0387	11 565	15 830	*96*	376	628	*95,3*

pétition avec le précurseur radioactif, sont réellement des précurseurs de biosynthèse des caroténoïdes, on doit observer une dilution de la radioactivité dans ces pigments.

Suivant une technique que nous avons décrite, chaque alcool diterpénique en émulsion dans une solution de *Tween* 80 est introduit dans un lot de feuilles de Maïs étiolé, en présence d'acétate radioactif. Les feuilles sont ensuite éclairées pendant 30 heures (4 500 lux). Si l'un des alcools incorporés dilue la radioactivité du ^{14}C provenant de l'acétate dans le pigment étudié, *il peut être considéré* comme un précurseur, situé après l'acétate, dans la biosynthèse de ce pigment.

Incorporation d'isophytol et de phytol non radioactifs.

Dans une première série d'expériences, nous avons éprouvé notre technique de dilution isotopique avec le phytol et l'isophytol. Les résultats sont consignés dans les tableaux 19 et 20 et permettent de tirer les conclusions suivantes :

TABLEAU 20

Action de l'isophytol et du phytol sur l'incorporation d'acétate-2-^{14}C de sodium dans le phytol des chlorophylles a *et* b (feuilles de Maïs)

Expériences n°		Teneurs en chlorophylle en mg/g de feuille		Radioactivités incorporées dans le phytol en c.p.m./g de chlorophylle		%	en c.p.m./g de feuille		%
		mesures	moyennes	mesures	moyennes		mesures	moyennes	
Chlorophylle a									
Témoins	1	0,413		13 930			5 750		
	2	0,379		9 670			3 670		
	3	0,395	0,395	11 500	11 700	*100*	4 540	4 653	*100*
+ Isophytol	4	0,444		14 680			6 520		
	5	0,458		6 400			2 930		
	6	0,365	0,422	14 640	11 906	*101,8*	5 196	4 882	*105*
+ Phytol	7	0,389		7 940			3 090		
	8	0,404		9 060			3 660		
	9	0,354	0,382	7 020	8 006	*68,5*	2 484	3 078	*66*
Chlorophylle b									
Témoins	1	0,181		12 740			2 310		
	2	0,178		9 380			1 670		
	3	0,183	0,180	13 220	11 780	*100*	2 420	2 133	*100*
+ Isophytol	4	0,195		15 120			2 958		
	5	0,206		6 680			1 380		
	6	0,171	0,191	8 220	10 006	*85*	1 410	1 916	*90*
+ Phytol	7	0,166		5 920			984		
	8	0,178		7 700			1 384		
	9	0,152	0,165	7 330	6 983	*59,3*	1 118	1 162	*54,5*

— l'isophytol est inactif sur l'incorporation de l'acétate 2-^{14}C dans le β-carotène, la lutéine et le phytol des chlorophylles. Cela signifie que l'isophytol ne participe pas à la biosynthèse de ces corps. Nous observons également que cet alcool diterpénique n'est pas toxique et que l'incorporation d'une émulsion ne freine pas l'infiltration de l'acétate de sodium dans le parenchyme foliaire ;

— le phytol fourni aux feuilles diminue la radioactivité incorporée dans le phytol des deux chlorophylles. On observe une dilution de radioactivité de 34 p. 100 pour le phytol de la chlorophylle *a* et de 45,5 p. 100 pour le phytol de la chlorophylle *b*. Or, nous savons que la dernière étape de la synthèse des chlorophylles est l'estérification du phytol par les chlorophyllides (Shlyk et *al.*, 1961). La technique que nous

utilisons est donc valable puisqu'elle permet de confirmer le rôle précurseur des molécules de phytol dans la biosynthèse des chlorophylles.

Incorporation de géranylgéraniol et de géranyllinalool non radioactifs.

Les résultats des tableaux 21 et 22 peuvent se résumer ainsi :

— le géranylgéraniol et le géranyllinalool diluent fortement (de 65 à 80 p. 100) la radioactivité incorporée dans le β-carotène foliaire à partir de l'acétate 2-^{14}C.

— le géranylgéraniol dilue la radioactivité dans le phytol de la chlorophylle *a* (40 p. 100), exactement comme le phytol dans la série précédente d'expériences. Il faut remarquer l'absence de dilution de la radioactivité dans le phytol de la chlorophylle *b* ; il est possible que l'acétate radioactif non métabolisé à cause de l'utilisation de géranylgéraniol exogène lors de la synthèse des caroténoïdes soit reporté vers la synthèse du phytol de la chlorophylle *b*.

TABLEAU 21

Action du géranyllinalool et du géranylgéraniol sur l'incorporation d'acétate 2-^{14}C de sodium dans le β carotène (feuilles de Maïs)

Expériences n°		Teneurs en pigment mg/g de feuille		Radioactivités spécifiques en c.p.m./mg de β-carotène			Radioactivités incorporées dans le β-carotène en c.p.m./g de feuille		
		mesures	moyennes	mesures	moyennes	%	mesures	moyennes	%
Témoins	1	0,0248		93 100			2 308		
	2	0,0269		85 000			2 205		
	3	0,0281	0,0266	93 800	90 633	*100*	2 638	2 383	*100*
+ Géranyl-linalool	4	0,0248		33 300			828		
	5	0,0243		20 850			508		
	6	0,0195	0,0228	60 900	38 350	*42,3*	1 187	841	*35,2*
+ Géranyl-géraniol	7	0,0207		19 120			397		
	8	0,0267		21 200			567		
	9	0,0196	0,0223	28 100	22 806	*25,2*	551	505	*21,6*

Une dernière série d'expériences a permis d'étendre ces résultats à la lutéine (tabl. 23) dont la radioactivité, comme celle du β-carotène, est très abaissée par ces deux alcools diterpéniques.

Nous devons remarquer que les dilutions observées portent sur les radioactivités incorporées, mais aussi sur les radioactivités spécifiques. Les teneurs en pigments ne variant pas significativement, les dilutions ne peuvent pas être dues à une inhibition de la biosynthèse, mais bien au fait que ces alcools diterpéniques sont métabolisés préférentiellement à l'acétate. Par ailleurs, nous avons vu que l'isophytol et le phytol ne diluent pas la radioactivité incorporée dans les caroténoïdes à partir de l'acétate 2-^{14}C. On peut en conclure que non seulement ces alcools ne sont pas des précurseurs de biosynthèse, mais que leurs produits de dégradation ne servent pas non plus à la synthèse des caroténoïdes, dans nos conditions expérimentales. En raison de l'analogie structurale entre ces 4 alcools diterpéniques, il est vraisem-

TABLEAU 22

Action du géranyllinalool et du géranylgéraniol sur l'incorporation d'acétate-2-^{14}C de sodium dans le phytol des chlorophylles a *et* b (feuilles de Maïs)

Expériences n°		Teneurs en chlorophylle		Radioactivités incorporées dans le phytol					
		mg/g de feuille		c.p.m./mg de chlorophylle			c.p.m./g de feuille		
		mesures	moyennes	mesures	moyennes	%	mesures	moyennes	%
Chlorophylle a									
Témoins	1	0,428		6 020			2 520		
	2	0,424		6 840			2 900		
	3	0,511	0,454	5 220	6 026	*100*	2 670	2 696	*100*
+ Géranyl-linalool	4	0,498		6 920			3 450		
	5	0,422		6 750			2 850		
	6	0,436	0,452	10 600	8 090	*134*	4 620	3 640	*135*
+ Géranyl-géraniol	7	0,442		4 540			2 008		
	8	0,490		2 825			1 385		
	9	0,410	0,447	3 460	3 608	*61*	1 419	1 604	*59,5*
Chlorophylle b									
Témoins	1	0,193		5 950			1 150		
	2	0,183		4 270			782		
	3	0,235	0,203	4 225	4 815	*100*	945	959	*100*
+ Géranyl-linalool	4	0,232		6 160			1 430		
	5	0,196	0,214	4 750	5 455	*113,3*	932	1 181	*123,3*
+ Géranyl-géraniol	7	0,198		4 800			950		
	8	0,217		4 875			1 062		
	9	0,180	0,198	4 935	4 870	*101*	890	967	*101*

TABLEAU 23

Action du géranyllinalool et du géranylgéraniol sur l'incorporation de l'acétate-2-^{14}C dans le β-carotène et dans la lutéine (feuilles de Maïs)

	β-caroténe			Lutéine		
	Teneurs en pigment (mg/g de feuille)	Radioactivités incorporées		Teneurs en pigment (mg/g de feuille)	Radioactivités incorporées	
		en c.p.m./g de feuille	%		en c.p.m./g de feuille	%
Témoin	0,0282	10 910	*100*	0,0413	2 805	*100*
+ Géranylgéraniol	0,0277	4 090	*37,4*	0,034	1 190	*42,4*
Témoin	0,0148	1 554	*100*	0,0579	205	*100*
+ Géranyllinalool	0,0108	597	*38,4*	0,0654	50	*24,5*

Les résultats rapportés dans ce tableau représentent les moyennes de 3 séries d'expériences.

blable que les produits de dégradation du géranylgéraniol ou du géranyllinalool ne sont pas non plus utilisés dans cette synthèse. Ainsi, les dilutions de radioactivité observées dans les pigments à partir du géranylgéraniol ou du géranyllinalool, proviennent bien d'une compétition directe entre les molécules d'acétate marqué et les molécules de ces alcools non dégradées.

Ces données semblent apporter la preuve expérimentale du rôle du géranylgéraniol comme précurseur immédiat du phytol et comme intermédiaire dans la synthèse du β-carotène et de la lutéine. Le géranylgéraniol et le géranyllinalool sont interchangeables dans la biosynthèse des caroténoïdes. Nous pouvons observer que la dilution de la radioactivité est sensiblement du même ordre de grandeur pour le β-carotène et pour la lutéine à partir de ces deux alcools : ce n'est donc pas à ce niveau (précurseur en C_{20}) que s'explique la différence entre la vitesse de biosynthèse du β-carotène et celle de la lutéine.

TABLEAU 24

Action du géranylgéraniol sur l'incorporation du mévalonate-2-^{14}C dans le β-carotène (feuilles de Maïs)

Éclairement : 28 heures — 4 500 lux.

Essais n°	Teneurs en β-carotène en mg/g de feuille	Radioactivités spécifiques en c.p.m./mg de pigment	Radioactivités incorporées	
			en c.p.m./g de feuille	%
Mévalonate-2^{14}C 1 μCi				
1	0,0231	598 000	13 800	*100*
2	0,0186	410 000	7 620	*100*
3	0,0214	394 000	8 430	*100*
Moyenne			9 950	*100*
Mévalonate-2-^{14}C 1 μCi Géranylgéraniol : 66 μg				
1	0,0165	280 000	4 625	*46,5*
2	0,0214	204 000	4 360	*44*
3	0,0220	266 000	5 860	*59*
Moyenne			4 948	*49,6*

Comme nous le verrons plus loin, en l'absence d'une dégradation préalable des alcools diterpéniques, ces résultats montrent que le géranylgéraniol peut être considéré comme un précurseur biologique situé après l'acide acétique dans la chaîne de biosynthèse. En répétant ce type d'expérience avec de l'acide mévalonique, nous voyons que le géranylgéraniol dilue la radioactivité du mévalonate 2-^{14}C de potassium dans le β-carotène des feuilles de Maïs (tabl. 24). *Au cours de la biosynthèse des caroténoïdes, le géranylgéraniol apparaît donc comme un précurseur intermédiaire situé après l'acide mévalonique.*

Incorporation d'alcools diterpéniques tritiés

Afin de confirmer les résultats des expériences de dilution isotopique, nous avons essayé d'infiltrer du géranylgéraniol et du géranyllinalool tritiés, en présence

de *Tween* 80, dans les feuilles excisées de plantules étiolées de Maïs. Après 30 heures d'éclairement, comme dans les expériences précédentes, les feuilles sont traitées par l'acétone : la radioactivité retrouvée dans l'extrait acétonique donne la mesure de la quantité totale d'alcool diterpénique tritié qui a pénétré dans le lot de feuilles.

TABLEAU 25

Incorporation de géranylgéraniol et de géranyllinalool tritiés dans les caroténoïdes et le phytol des feuilles de Maïs étiolées, à la lumière

Expériences n°		Géranylgéraniol				géramyllinalool			
		Teneurs en pigments en µg/g de feuille	Radioactivités incorporées		% d'alcool infiltré	Teneurs en pigments en µg/g de feuille	Radioactivités incorporées		% d'alcool infiltré
			en c.p.m./g de feuille	en % de l'extrait acétonique			c.p.m. de feuille	en % de l'extrait acétonique	
β-carotène	1	27,9	24 700	*12,2*		33,1	9 500	*5,8*	
	2	17,5	3 600	*0,6*		22,8	95 200	*2,75*	
	3	31,4	8 130	*2,1*		30,6	12 170	*10,1*	
	4	32,6	40 400	*6,8*		27,6	22 500	*7,6*	
Lutéine	1	56	2 660	*1,3*		56	4 080	*2,5*	
	2	41	2 930	*0,4*		51,2	2 880	*0,08*	
Phytol de la chlorophylle *a*	1	678	53 400	*26,6*		830	5 090	*3,1*	
	2	668	549 000	*85*		632	20 300	*0,6*	
	3	558	186 000	*48,3*		517	15 160	*12,6*	
	4	593	116 500	*19,7*		533	18 150	*6,1*	
Phytol de la chlorophylle *b*	1	208	9 240	*4,6*		291	9 320	*5,6*	
	2	218	15 300	*2,4*		244	15 550	*0,4*	
	3	252	9 910	*2,6*		222	3 840	*3,2*	
	4	258	53 400	*8,8*		231	20 350	*6,9*	
Radioactivité retrouvée dans l'extrait acétonique	1		202 000	*100*	3,3		164 500	*100*	3,4
	2		646 000	*100*	10,6		3 462 000	*100*	72,8
	3		385 230	*100*	9,2		120 020	*100*	2,8
	4		592 070	*100*	14,2		295 290	*100*	6,8
Radioactivité fournie aux feuilles	1 et 2		6 115 000		100		4 760 000		100
	3 et 4		4 180 000		100		4 280 000		100

Si nous comparons cette radioactivité à la radioactivité réellement fournie aux feuilles dans le tube, nous obtenons le pourcentage d'infiltration (tabl. 25) : nous voyons que ce pourcentage est très variable (de 3 p. 100 à 72 p. 100) ce qui explique les fortes variations observées par rapport à la moyenne dans les résultats des expériences de dilution de radioactivité. Cette dispersion des résultats vient de la difficulté de reproduire quantitativement à chaque expérience l'infiltration totale des émulsions dans les feuilles.

Nous mesurons l'utilisation de l'alcool incorporé dans un pigment par le pour-

centage de radioactivité retrouvée dans ce pigment par rapport à la radioactivité de l'extrait acétonique.

Dans le tableau 26 qui regroupe les moyennes des résultats expérimentaux figurant dans le tableau 25 nous voyons que :

TABLEAU 26

Intégration du géranylgéraniol et du géranyllinalool tritiés dans le phytol et dans le β-carotène des feuilles de Maïs étiolé, à la lumière

	Radioactivités incorporées en % de l'extrait acétonique	
	Géranylgéraniol	Géranyllinalool
Phytol de la chlorophylle *a*	44,6	5,6
Phytol de la chlorophylle *b*	4,6	4
Phytol total	49,2	9,6
β-carotène	5,4	6,5

— près de la moitié de la radioactivité du géranylgéraniol infiltré se retrouve dans le phytol des chlorophylles (49,2 p. 100). En comparaison le géranyllinalool n'est presque pas utilisé pour la synthèse du phytol (9,6 p. 100) ;

— le géranylgéraniol se retrouve principalement dans le phytol de la chlorophylle *a*. Comme dans les expériences de dilution de radioactivité, la synthèse du phytol de la chlorophylle *b* ne semble utiliser qu'une faible proportion du géranylgéraniol : la signification précise de ce fait ne nous apparaît pas ;

— le géranyllinalool est aussi actif que le géranylgéraniol dans la biosynthèse du β-carotène.

Ces résultats expérimentaux confirment pleinement ceux des expériences de dilution de radioactivité par compétition métabolique.

Le fait que le géranyllinalool puisse dans une faible mesure servir de précurseur au phytol, et qu'il puisse remplacer le géranylgéraniol dans la biosynthèse des caroténoïdes conduit à penser que chacun de ces deux alcools diterpéniques peut, *in vivo*, se transformer en son isomère allylique :

$$\text{géranylgéraniol} \rightleftharpoons \text{géranyllinalool}$$

Afin d'éprouver la valeur de cette hypothèse, nous avons comparé les rendements d'incorporation dans les caroténoïdes de feuilles de Maïs de la radioactivité constituée d'une part de géranylgéraniol tritié seul, d'autre part d'un mélange à peu près équimoléculaire de géranylgéraniol et de géranyllinalool tritiés. Dans les deux séries d'expériences, la radioactivité spécifique des deux alcools est sensiblement la même. L'éclairement (4 500 lux) dure 24 heures et dans ces conditions la quantité de β-carotène synthétisée est moins élevée qu'en 30 heures. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 27.

Nous voyons que malgré la grande dispersion des résultats un mélange équimoléculaire de géranylgéraniol et de géranyllinalool est aussi bien utilisé pour la synthèse des caroténoïdes que la quantité équivalente de géranylgéraniol pur. En

d'autres termes, il apparaît qu'une molécule de géranylgéraniol, associée à une molécule de géranyllinalool conduit à une molécule en C_{40} de tétraterpène de même que deux molécules de géranylgéraniol. L'isomérisation de ces deux alcools diterpéniques l'un en l'autre est donc bien possible *in vivo*.

TABLEAU 27

Comparaison entre l'incorporation de géranylgéraniol seul et l'incorporation simultanée de géranylgéraniol et de géranyllinalool tritiés dans les caroténoïdes de la plantule de Maïs

Durée d'éclairement : 24 heures Expériences n°	Géranylgéraniol			Géranylgéraniol + Géranyllinalool		
	Teneurs en pigments en c.p.m./g de feuille	Radioactivités incorporées		Teneurs en pigments en c.p.m./g de feuille	Radioactivités incorporées	
		en c.p.m./g de feuille	en % de l'activité de l'extrait acétonique		en c.p.m./g de feuille	en % de l'activité de l'extrait acétonique
β-carotène						
1	0,0211	790	0,1	0,0237	1 100	0,21
2	0,0241	800	0,2	0,0177	2 260	0,07
3	0,0220	1 410	0,25	0,025	1 920	0,30
moyenne			*0,18*			*0,19*
Lutéine						
1	0,0464	2 580	0,33	0,056	2 500	0,49
2	0,0463	905	0,23	0,054	2 060	0,06
3	0,040	910	0,16	0,046	1 280	0,20
moyenne			*0.24*			*0.25*
Radioactivité dans l'extrait acétonique						
1		778 000	100		509 000	100
2		397 000	100		3 380 000	100
3		563 000	100		644 000	100
Radioactivité totale fournie aux feuilles	Géranylgéraniol : 6 115 000			Géranylgéraniol : 3 057 000 Géranyllinalool : 3 412 000 Total 6 469 000		

Recherche du géranylgéraniol in vivo

Les expériences que nous venons de décrire font apparaître le géranylgéraniol comme la substance intermédiaire située au carrefour des voies de biosynthèse du phytol des chlorophylles et des caroténoïdes dans les chloroplastes. Dans la première partie de cette étude, nous avons vu que le géranylgéraniol et le géranyllinalool avaient été isolés ou caractérisés dans plusieurs tissus végétaux. Mais jusqu'à maintenant, l'existence de ces alcools dans les feuilles n'a pas été rapportée.

Nous avons d'abord recherché la présence des alcools terpéniques dans les extraits lipidiques de feuilles, après extraction par l'acétone ou par l'éther de pétrole : par microchromatographie des extraits, nous n'avons jamais pu caractériser un alcool

terpénique libre autre que le phytol provenant des chlorophylles après saponification.

Or, nous avons vu qu'au cours de la biosynthèse des stérols, les alcools en C_5, C_{10} et C_{15} sont sous forme de pyrophosphates. Nous avons pensé que dans les feuilles il pouvait en être de même pour le géranylgéraniol et nous avons utilisé la technique décrite par GOODMAN et POPJAK (1960) pour extraire les pyrophosphates de terpényle

FIG. 36. — *Microchromatographie de l'extrait P_2 de feuilles de Tomate* (selon la technique de GOODMAN et POPJAK, 1960) — 11,7 g de folioles — gg : géranylgéraniol — Révélateur : $KMnO_4$

FIG. 37. — *Microchromatographie de l'extrait P_2 de feuilles de Tomate* (selon la technique de GOODMAN et POPJAK, 1960) — 582 g de folioles — gg : géranylgéraniol — Révélateur $KMnO_4$

à partir de broyats de foie. Cette technique consiste à broyer les feuilles en présence de collidine (de 5 à 10 ml par g de feuille) en refroidissant : *afin d'inhiber les phosphatases, nous avons ajouté 20 mg de NaF au cours de cette extraction.* L'extrait collidinique obtenu est agité avec 2 volumes d'éther éthylique et 3 fois 1 volume d'une solution 0,01 M de KCO_3H : c'est une délipidation qui permet de rassembler les pigments liposolubles dans l'épiphase (éther + collidine). L'hypophase aqueuse, de couleur jaune, est évaporée à sec, à froid : le résidu brun est repris par de l'éthanol à 90 p. 100 à une température voisine de 0°C. Au cours de cette opération, les nucléotides se séparent des pyrophosphates de terpényle qui passent en solution dans l'étha-

nol. La solution éthanolique est alors évaporée et le résidu est repris par une solution 0,01 M de KCO_3H (10 ml). Cette solution est alors soumise à une hydrolyse acide (Cl_3C—COOH à 5 p. 100) qui libère les alcools que l'on peut rassembler dans un faible volume d'hexane (0,1 ml à 2 ml) après neutralisation : c'est dans la solution hexanique P_2 (fig. 36 à 39) qu'on recherche les alcools terpéniques par microchromatographie sur acide silicique.

Nous avons fait plusieurs essais sur les limbes de Tomate. Dans un premier essai nous avons procédé à une extraction sur 11,7 g de folioles de Tomate ayant flotté 23 heures sur milieu nutritif de BANDURSKI (1949), à la lumière (4 500 lux). Sur chromatoplaque, l'extrait P_2 donne 4 taches révélables par $KMnO_4$ dont l'une émigre

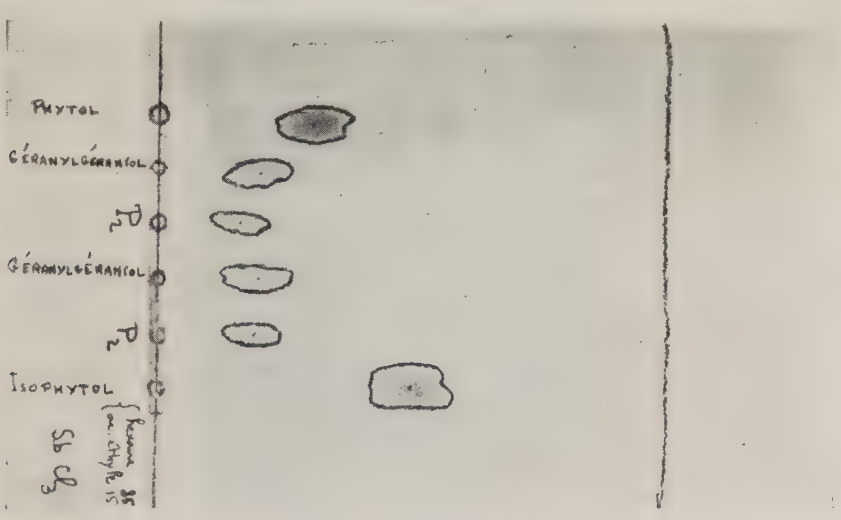


FIG. 38. — *Microchromatographie de l'extrait P_2 de feuilles de Tomate* (selon la technique de GOODMAN et POPJAK, 1960) — 582 g de folioles — Révélateur : $SbCl_3$

comme le géranylgéraniol (fig. 36) : de plus, cette tache est révélable par $SbCl_3$ comme le géranylgéraniol.

Nous avons alors recommencé cette extraction en partant de 582 g de folioles de Tomates prélevées en plein champ. Par microchromatographie de l'extrait P_2, nous avons révélé 6 taches par $KMnO_4$, dont l'une :

— a un R_F très proche de celui du géranylgéraniol et cela même si l'activité des chromatoplaques varie (fig. 37 et 38) ;

— est révélable par $SbCl_3$ avec une couleur mauve virant au gris (fig. 38).

La substance correspondant à cette tache se comporte donc comme le géranylgéraniol.

Le seuil de sensibilité des taches de géranylgéraniol révélées au permanganate de potassium étant de 0,05 µg, nous avons calculé que la masse de « géranylgéraniol » extraite par cette méthode ne peut dépasser 0,1 µg par g de limbe foliaire. Pour en extraire 10 mg afin de l'identifier, il faudrait traiter 100 kg de feuille fraîche.

Par chromatographie en phase gazeuse, les alcools diterpéniques sont séparables sur Apiezon à 190° et sortent de la colonne avec un volume de rétention élevé (POPJAK et CORNFORTH, 1960 *b*) : au cours de nos essais, les faibles quantités de « géranyl-

géraniol » injectées (inférieures à 10 µg) ont probablement été détruites sur la colonne.

Nous n'avons donc pas pu pousser plus loin la caractérisation du géranylgéraniol. Mais nous avons fait une autre extraction sur des feuilles de Tomate (11,5 g) ayant flotté 24 heures à la lumière (4 500 lux) sur un milieu nutritif contenant de l'iodoacétate de sodium $0{,}5.10^{-3}$ M. Nous savons que l'iodoacétate inhibe la réaction d'isomérisation de l'isopentényl pyrophosphate en diméthylallylpyrophosphate

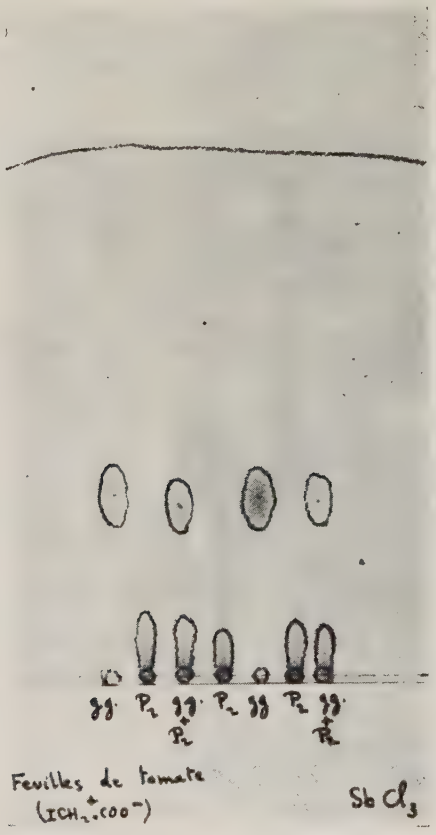


FIG. 39. — *Microchromatographie de l'extrait P_2 de feuilles de Tomate* (selon la technique de GOODMAN et POPJAK, 1960) — 11,5 g de folioles inhibées par l'iodoacétate de sodium

(tabl. 3), bloquant ainsi la synthèse de tous les autres alcools terpéniques. Effectivement, dans cet essai, nous n'avons pas pu déceler la substance semblable au géranylgéraniol (fig. 39).

Dans les plantules de Maïs étiolées en voie de verdissement, nous avons caractérisé la même substance. Par la même technique, nous avons caractérisé le géranylgéraniol et le géraniol dans les feuilles d'un mutant de *Lycopersicum esculentum*, pauvre en chlorophylles et en caroténoïdes (type *Xantha*, LEFORT, 1959).

Il semble donc bien que le géranylgéraniol existe dans les feuilles vertes, mais comme nous l'avons vu, en très faible quantité. En revanche, nous n'avons jamais décelé de géranyllinalool dans nos extraits.

III. — Conclusions sur la biosynthèse des chaînes carbonées du phytol et des caroténoïdes

La première partie de ce travail nous permet de donner une réponse à certaines questions mises en lumière dans notre étude bibliographique.

Il y a d'abord une confirmation expérimentale du schéma de biosynthèse communément accepté pour les caroténoïdes (Goodwin, 1963). Pour le β-carotène et pour les xanthophylles, la biosynthèse se fait comme pour les triterpènes à partir de

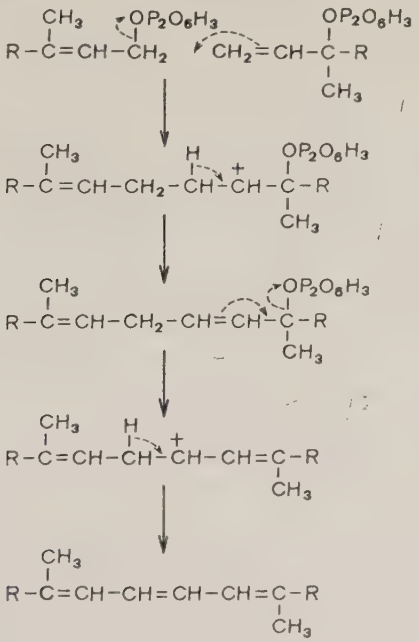


Fig. 40. — *Schéma de la condensation du géranylgéraniol et du géranyllinalool, d'après le schéma général proposé par* Popjak *et* Cornforth (1960 *a*)

l'acétate, puis du mévalonate. Par ailleurs, il est connu que chez les végétaux cette chaîne de biosynthèse se poursuit jusqu'au pyrophosphate de farnésyle. Nous avons caractérisé le géranylgéraniol dans les feuilles et nous avons montré que ce métabolite est, après l'acétate et le mévalonate, un précurseur des caroténoïdes foliaires. Cela permet de penser que, de même que 2 molécules de farnésol (C_{15}) se condensent pour donner 1 molécule de squalène (C_{30}), 2 molécules de géranylgéraniol se condensent pour conduire à 1 molécule en C_{40} comme l'avaient suggéré Kuhn et Grundmann (1932). Grob et *al.* (1961 *a*) pensent que le lycopersène est le premier produit de cette condensation. Mais l'absence du lycopersène dans les feuilles vient d'être démontrée par Mercer, Davies et Goodwin (1963) qui concluent que le premier produit en C_{40} formé à partir d'un précurseur en C_{20} doit être le phytoène. Cela suppose qu'il n'y a pas de réduction après la dimérisation, comme dans le schéma proposé par Popjak et Cornforth (1960 *a*) où la condensation porte sur deux molécules asymétriques, l'une alcool primaire, l'autre alcool tertiaire (fig. 40).

Or, bien que nous n'ayons pu isoler le géranyllinalool à partir des feuilles, nous avons montré qu'il se comporte *exactement* comme le géranylgéraniol dans la synthèse des caroténoïdes. Certains auteurs ont considéré comme un artefact l'alcool tertiaire obtenu en même temps que l'alcool primaire lors de l'hydrolyse acide du pyrophosphate de prényle (Lynen et *al.*, 1959 ; Goodman et Popjak, 1960). Pour la première fois, nous démontrons que l'alcool tertiaire est biologiquement aussi actif que l'alcool primaire et ne peut pas être considéré comme un artefact d'extraction.

En conclusion, il semble que le géranylgéraniol peut s'isomériser en géranyllinalool, et qu'ensuite une molécule de l'un se condense avec une molécule de l'autre pour donner, sans réduction, une molécule de tétraterpène, probablement de phytoène. Dans la seconde partie de ce travail, nous allons essayer de voir comment un tétraterpène acyclique peut être transformé en carotène et en xanthophylle.

Le géranylgéraniol apparaît sans équivoque comme le précurseur du phytol de la chlorophylle a, et dans une moindre mesure du phytol de la chlorophylle *b*.

En effet, nous avons déjà dit que nous ne savions comment interpréter la faible proportion de géranylgéraniol transformé en phytol de la chlorophylle *b*. Si l'on admet que la chlorophylle *a* est oxydée en chlorophylle *b*, le géranylgéraniol qui a servi à la synthèse du phytol de la chlorophylle *a* doit se retrouver dans le phytol de la chlorophylle *b*. Dans ces conditions, une hypothèse possible est que la transformation chlorophylle *a* → chlorophylle *b* porte sur le noyau tétrapyrrolique séparé du groupe phytyle, et que le phytol de la chlorophylle *b* ne dérive pas nécessairement du phytol de la chlorophylle *a*. Il y a là un fait troublant qui repose le problème du passage de la chlorophylle *a* à la chlorophylle *b*.

Néanmoins pour la première fois nous démontrons l'existence d'un métabolite en C_{20} commun à la biosynthèse des caroténoïdes et du phytol des chlorophylles, ce qui explique les liens observés entre ces deux classes de pigments.

Cependant nous avons confirmé la grande différence entre la vitesse de biosynthèse des chlorophylles et celle des caroténoïdes. Et nous avons vu que dans la plupart des expériences, à partir de précurseurs lointains du métabolisme intermédiaire, la radioactivité spécifique du β-carotène est supérieure à celle des xanthophylles. Ce fait peut signifier que le β-carotène est le précurseur biologique des xanthophylles, en confirmation des travaux de Claes (1959). Dans la dernière partie de ce travail, nous voulons essayer d'approfondir nos connaissances sur les dernières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes dans les feuilles.

C. Métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles

Au cours de cette étude, nous avons été amené à préciser certaines des observations faites sur le *turn-over* du β-carotène et des xanthophylles ; comme dans la première partie, nous avons réalisé des expériences sur des feuilles entières alimentées avec de l'acétate-2-^{14}C, du mévalonate-2-^{14}C ou de l'eau tritiée. Les résultats de ces expériences nous ont suggéré la possibilité de réactions de réduction que nous avons essayé de confirmer en incubant des caroténoïdes radioactifs avec des chloroplastes.

I. — Évolution de la radioactivité spécifique des caroténoïdes après incorporation d'acétate-2-^{14}C dans les feuilles

Dans les expériences précédentes (tabl. 14), nous avons observé que le ^{14}C de l'acétate qui a pénétré dans les folioles de Tomate pendant 7 h à l'obscurité se retrouve dans le β-carotène et dans la violaxanthine mais non dans la lutéine. Cette observation nous a conduit à choisir ce temps d'incorporation continue de métabolite marqué, à l'obscurité. Afin de saisir d'éventuelles réactions entre les caroténoïdes, nous avons tracé les courbes représentant les variations de leur radioactivité spécifique en fonction du temps, à partir du moment où les folioles sont privées de précurseur radioactif.

Les demi-folioles sont prélevées le soir à 18 heures et placées sur milieu radioactif à l'obscurité, pendant 7 heures dans des boîtes de Petri fermées. Ensuite, sous une faible lumière verte, les demi-folioles sont rincées à l'eau permutée, séchées et placées sur un nouveau milieu nutritif non radioactif : on supprime ainsi l'alimentation continue des limbes en précurseur marqué. La moitié du lot de folioles demeure à l'obscurité, l'autre moitié est éclairée uniformément par deux tubes fluorescents (4 200 lux). A partir du changement de milieu, on prélève au hasard, des échantillons de 3 demi-folioles non appariées :

au temps 0, à l'obscurité ;
après 10 mn, 30 mn, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, à la lumière.
après 1 h, 2 h, 4 h, 6 h et 8 h, à l'obscurité.

Nous avons résumé les résultats obtenus dans le tableau 28 et dans les figures 41 et 42.

Au bout de sept heures d'incorporation continue à l'obscurité, la zéaxanthine et la violaxanthine ont les radioactivités spécifiques les plus élevées (tabl. 28). Viennent ensuite l'époxylutéine, la néoxanthine et le β-carotène. La lutéine n'est pas radioactive.

Il semble donc que dans nos conditions expérimentales, les folioles de Tomate synthétisent principalement à l'obscurité :

les xanthophylles de structure β ;
les époxydes : violaxanthine et époxylutéine.

Après la suppression du précurseur marqué dans le milieu nutritif, la répartition de la radioactivité entre les caroténoïdes varie beaucoup, à l'obscurité (fig. 41).

La radioactivité spécifique de la violaxanthine diminue et dans le même temps, les radioactivités spécifiques du β-carotène, de la lutéine, de l'époxylutéine et de la néoxanthine augmentent et atteignent un maximum après une heure. Ensuite la radioactivité disparaît successivement dans l'époxylutéine (4 heures), la néoxanthine (6 heures) et la lutéine (8 heures). Ces variations traduisent les réactions des caroténoïdes dans les feuilles et nous permettent d'observer que :

- la radioactivité spécifique de l'époxylutéine, d'abord très supérieure à celle de la lutéine, s'annule avant celle de la lutéine. Donc, à *l'obscurité, l'époxylutéine ne peut pas être le produit de la lutéine.*

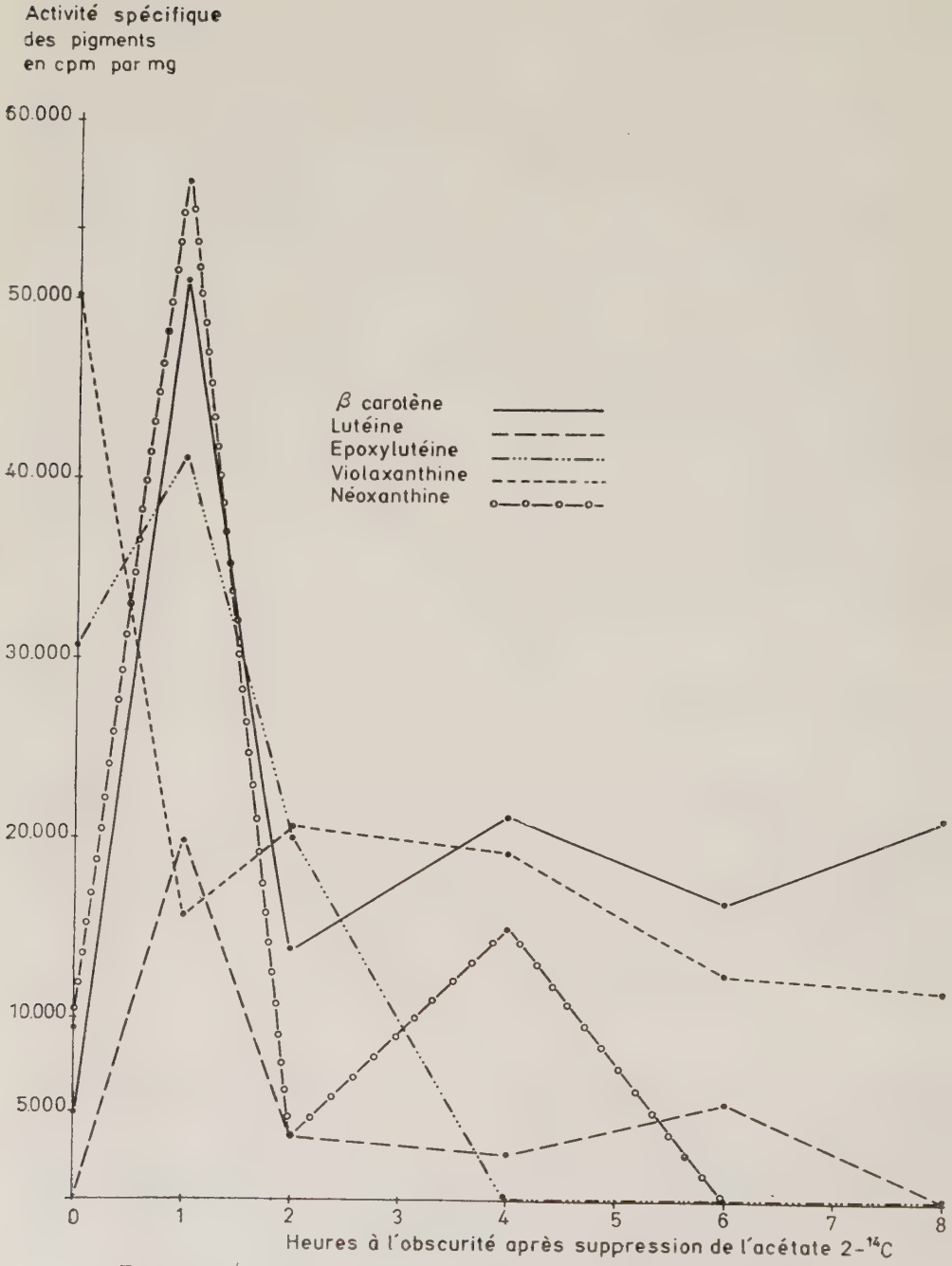


FIG. 41. — *Évolution, à l'obscurité, de la radioactivité spécifique des caroténoïdes après incorporation d'acétate-2-^{14}C dans les folioles de Tomate à l'obscurité*

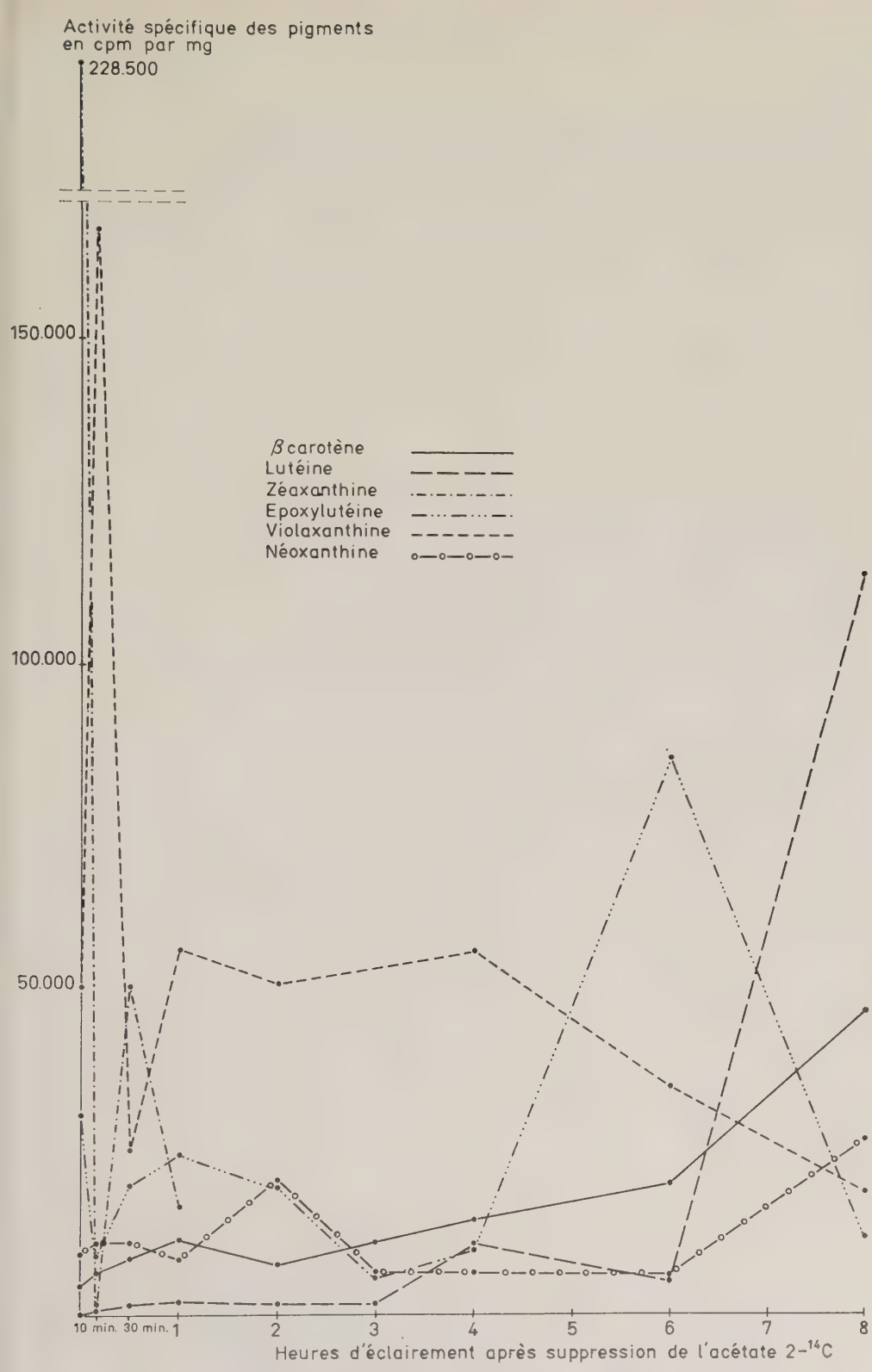


FIG. 42.— *Évolution, à la lumière, de la radioactivité spécifique des caroténoïdes après incorporation d'acétate-2-^{14}C dans les folioles de Tomate à l'obscurité*

TABLEAU 28

Radioactivités spécifiques (R.S.) et radioactivités incorporées (R.I.) dans les caroténoïdes de folioles de Tomate à partir d'acétate 2-^{14}C

Poids des folioles : 5,781 g. Matière sèche : 20 p. 100.
Acétate 2-^{14}C de sodium : 0,44 mg
0,55 µCi par ml de solution.

	Incorporation continue d'acétate 2-^{14}C 7 heures à l'obscurité			Sans acétate 2-^{14}C					
				+ 8 heures lumière			+ 8 heures obscurité		
	Teneurs (µg/g de foliole)	R.S. (c.p.m./µg de pigment)	R.I. (c.p.m./g de foliole)	Teneurs (µg/g de foliole)	R.S. (c.p.m./µg de pigment)	R.I. (c.p.m./g de foliole)	Teneurs (µg/g de foliole)	R.S. (c.p.m./µg de pigment)	R.I. (c.p.m./g de foliole)
β carotène	95,4	4,8	457	92,8	46,6	4 325	87,3	21,18	1 845
Zéaxanthine	9,6	228,5	2 195	~ 0	—	—	0	—	—
Violaxanthine		50,2			18,85			11,71	
+Auroxanthine. (Teneurs exprimées en violaxanthine)	47,5		1 425	45,1		1 766	33,4		176
Lutéine	93,6	0	0	110	114,3	12 580	88,2	0	0
Époxylutéine	7,8	30,8	243	8,2	12	98	5,6	0	0
Néoxanthine	23,5	9,46	222	25,4	27,05	689	12,8	0	0
Total	277,4		4 542	281,5		19 458	237,3		2 021
Violaxanthine / β carotène		10,4			0,41			0,55	

— seuls le β-carotène et la violaxanthine restent marqués 8 heures après le passage des folioles sur milieu non radioactif : mais le *rapport de la radioactivité spécifique de la violaxanthine à celle du β-carotène diminue,* passant de 10,4 à 0,55 (tabl. 28).

Nous voyons se confirmer l'observation d'une synthèse préférentielle des caroténoïdes de structure β à l'obscurité.

Si la suppression de l'acétate radioactif coïncide avec l'éclairement, dès les premières minutes l'action de la lumière est remarquable (fig. 42) :

— les radioactivités spécifiques de la zéaxanthine, de la violaxanthine et de l'époxylutéine subissent d'amples variations, très rapides au cours de la première heure d'éclairement.

— *les variations des radioactivités spécifiques* (*R.S.*) *de la zéaxanthine et de la violaxanthine sont antiparallèles pendant cette période.* En effet, dans les 10 premières minutes de l'éclairement, la R.S. de la zéaxanthine diminue fortement pendant que celle de la violaxanthine augmente jusqu'à un maximum. Ces variations de radioactivité spécifique peuvent traduire une transformation de zéaxanthine en violaxanthine. Ensuite, la R.S. de la zéaxanthine s'élève à nouveau en même temps que celle de la violaxanthine diminue : au cours de cette période (de la 10e à la 30e minute d'éclairement) il semble que la violaxanthine se transforme en zéaxanthine. Ces faits permettent de supposer une réaction d'équilibre dans les feuilles :

$$2\ (O) + \text{zéaxanthine} \rightleftharpoons \text{violaxanthine}$$

La possibilité d'une telle réaction a d'ailleurs été montrée par Yamamoto, Nakayama et Chichester (1962 *a*), dans les feuilles d'Épinard et de Haricot, pour la même durée d'éclairement, dans des conditions expérimentales différentes. Nous n'avons pas pu déterminer la radioactivité spécifique de la zéaxanthine au-delà de 1 heure, les teneurs trop faibles de ce pigment ne permettant de faire ni le spectre d'absorption, ni des comptages significatifs.

Pendant 6 heures, *les radioactivités spécifiques du β-carotène et de la lutéine augmentent régulièrement* (fig. 42), *en restant très inférieures à celle de la violaxanthine.* Il ne semble donc pas que le β-carotène puisse être seul précurseur dans la biosynthèse de la violaxanthine. De même la lutéine ne peut pas être le seul précurseur de l'époxylutéine qui a une radioactivité spécifique supérieure à celle de la lutéine.

Au bout de 8 heures d'éclairement, la radioactivité spécifique des époxydes a diminué et l'on constate que celle de la lutéine a fortement augmenté, devenant 2,5 fois plus forte que celle du β-carotène.

Dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons procédé à une incorporation de DL-*mévalonate-2-*^{14}C *de potassium dans les folioles de Tomate.*

Dans ces expériences, nous n'avons pas pu isoler la zéaxanthine en quantité assez grande pour la caractériser.

L'examen du tableau 29 nous montre que les résultats sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus à partir de l'acétate radioactif :

— à l'obscurité les feuilles synthétisent préférentiellement les xanthophylles

TABLEAU 29

Radioactivités spécifiques (R.S.) et radioactivités incorporées (R.I.) dans les caroténoïdes de folioles de Tomate à partir de DL-*mévalonate* 2-^{14}C

Poids des folioles : 4,742 g. Matière sèche : 19,5 p. 100.
Mévalonate 2-^{14}C de potassium : 9,85 mg
0,55 µCi par ml de solution.

	Incorporation continue de DL-mévalonate-2-^{14}C 7 heures à l'obscurité			Sans DL-mévalonate-2-^{14}C					
				+ 8 heures lumière			+ 8 heures obscurité		
	Teneurs (µg/g de foliole)	R.S. (c.p.m./µg de pigment)	R.I. (c.p.m./g de foliole)	Teneurs (µg/g de foliole)	R.S. (c.p.m./µg de pigment)	R.I. (c.p.m./g de foliole)	Teneurs (µg/g de foliole)	R.S. (c.p.m./µg de pigment)	R.I. (c.p.m./g de foliole)
β-carotène	104,5	25,42	2 660	90	108,2	9 750	82,8	107,5	8 900
Violaxanthine	46,5	359	16 700	53,2	52	2 770	47	40,9	1 920
Lutéine	103,5	0	0	104	4,8	500	102	13,22	1 350
Époxylutéine	7,5	36,8	278	12,8	11,9	152	7,4	48	413
Néoxanthine	15,6	0	0	19,4	1,53	30	11,2	27,7	310
Total	277,6		19 638	279,4		13 202	250,4		12 893
$\frac{\text{Violaxanthine}}{\beta\text{-carotène}}$		14			0,48			0,38	

époxydes et particulièrement la violaxanthine, de structure β. L'époxylutéine est formée avant la lutéine ;

— à la lumière comme à l'obscurité, dès qu'on supprime le précurseur radioactif dans le milieu nutritif, la radioactivité spécifique (R.S.) de la violaxanthine diminue : le rapport $\frac{\text{R.S. violaxanthine}}{\text{R.S. β-carotène}}$ passe de 14 à environ 0,4.

Discussion

Nous ne voulons pas attacher à ces résultats expérimentaux une valeur de démonstration, car ces expériences n'ont pas fait l'objet d'un grand nombre de répétitions. Mais les observations que nous avons recueillies ont l'avantage de refléter les réactions des caroténoïdes *in vivo*. Pour nous en tenir aux résultats obtenus à

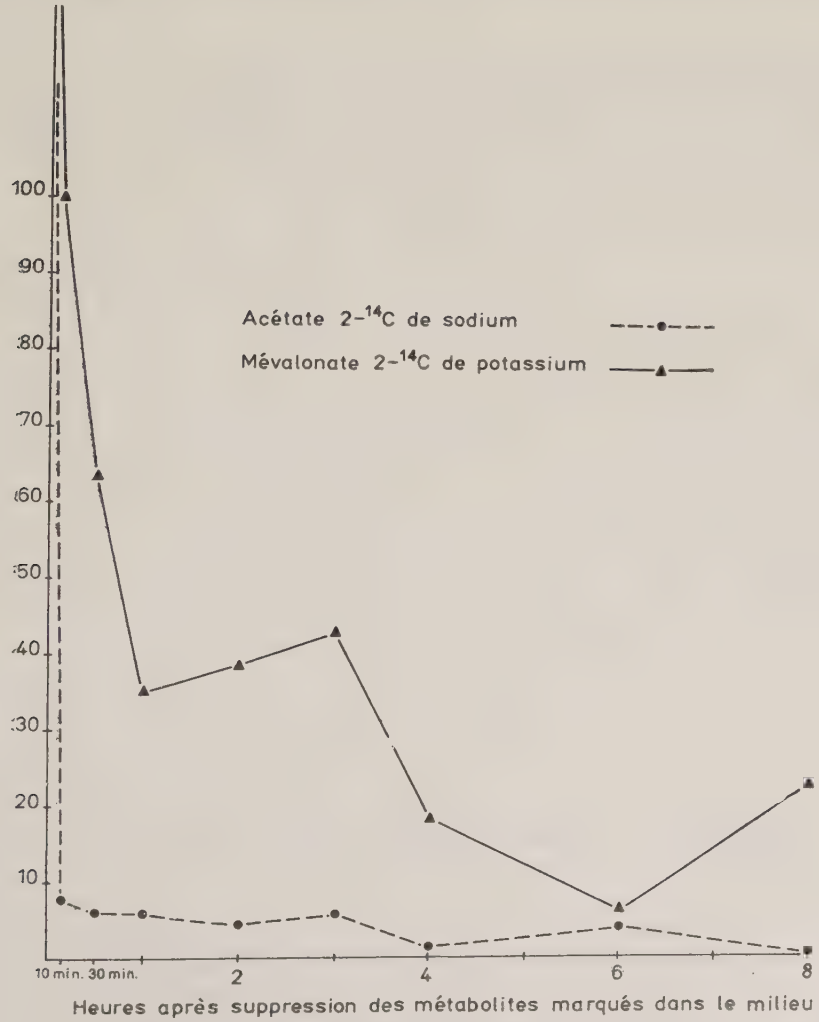


FIG. 43. — *Variations du rapport R.S. β-carotène/R.S. lutéine en fonction du temps d'éclairement après suppression des précurseurs marqués dans le milieu nutritif*

partir de l'acétate radioactif et confirmés à partir du mévalonate-2-^{14}C, il nous semble possible de suggérer les idées suivantes :

— *le β-carotène et la lutéine paraissent être synthétisés dans les feuilles indépendamment l'un de l'autre, avec des vitesses différentes.*

En effet, dans aucun cas les variations de la radioactivité spécifique du β-carotène ne semblent avoir de répercussions sur celles de la lutéine. Certes, le rapport de la vitesse de biosynthèse du β-carotène à celle de la lutéine, mesuré par le rapport de leurs radioactivités spécifiques, diminue avec le temps (fig. 43) : mais les radioactivités spécifiques des deux pigments augmentant en même temps, cette diminution du rapport des R.S. ne signifie pas nécessairement que le β-carotène se transforme en lutéine. Cependant nous essaierons de résoudre ce problème par des expériences d'incubation de β-carotène radioactif en présence de chloroplastes.

TABLEAU 30

Incorporation de DL-*mévalonate* 2-^{14}C *dans les caroténoïdes de chloroplastes*

	Expérience 1 Radioactivités spécifiques en c.p.m./µg de pigment		*Expérience 2* avec ATP		
	Avec ATP	Sans ATP	Teneurs en pigments (µg)	Radioactivités spécifiques (c.p.m./µg)	Radioactivités incorporées (c.p.m)
β-carotène	11,5	0	76,5	2,46	188
Lutéine	3,58	0	123	1,46	180
Zéaxanthine	—	—	19,6	11,1	217
Époxylutéine	—	—	16	9,7	155
Violaxanthine	—	—	30,2	5,55	168
Néoxanthine	—	—	9,2	2,28	21
Total des caroténoïdes	—	—	274,5	—	929

Milieu d'incubation : tampon phosphate pH 7,15
NaF : 100 µmoles
$MgCl_2$: 50 µmoles
ATP : 20 µmoles
} dans 15 ml de suspension
Teneur en chlorophylle : 3,26 mg
Mévalonate-2-^{14}C de potassium : 2 µCi $t = 25°$ C.

Nous devons noter que, pour un temps d'éclairement assez long, la lutéine peut avoir une radioactivité spécifique supérieure à celle du β-carotène. Ce fait nouveau a été observé en présence d'acétate-2-^{14}C à la lumière et ne pouvait être mis en évidence que par une expérience cinétique. La radioactivité spécifique de la lutéine biosynthétisée à partir de $^{14}CO_2$ a toujours été trouvée inférieure à celle du β-carotène dans des expériences statiques. L'inversion de ce rapport observée ici, n'est pas surprenante : la teneur de la lutéine étant toujours plus grande que celle du β-carotène dans les feuilles vertes, il est normal qu'à certains moments la synthèse de la lutéine soit plus active que celle du β-carotène.

— *la lutéine ne peut pas être le seul précurseur de l'époxylutéine.* Celle-ci ayant une radioactivité spécifique souvent inférieure à celle de la violaxanthine, il convient de rechercher avec des chloroplastes isolés, dans quelle mesure l'époxylutéine peut dériver de la violaxanthine.

— *les rapides variations de radioactivité spécifique observées dans la série des caroténoïdes de structure β sont étroitement associées à des variations de la violaxanthine.*

En effet de tous les caroténoïdes, à la lumière comme à l'obscurité, c'est la violaxanthine dont la radioactivité spécifique réagit le plus rapidement à la suppression des précurseurs marqués dans le milieu nutritif. A l'obscurité, après la zéaxanthine (quand nous avons pu l'isoler), la violaxanthine est le caroténoïde qui a la plus forte radioactivité spécifique (R.S.). Celle-ci diminue tout en demeurant longtemps supérieure à celle du β-carotène : dans ces conditions la décroissance du rapport $\frac{\text{R.S. violaxanthine}}{\text{R.S. β-carotène}}$ (tabl. 28 et 29) suggère la possibilité d'une transformation de la violaxanthine en β-carotène.

Ces résultats expérimentaux nous permettent de soupçonner certaines réactions d'interconversion entre les caroténoïdes. Pour confirmer ou infirmer ces possibilités réactionnelles, il nous a paru indispensable de mélanger directement des caroténoïdes marqués au ^{14}C à des chloroplastes actifs.

II. — Incubation de caroténoïdes radioactifs avec des chloroplastes

Transformation de certains polyènes acycliques en carotène et en xanthophylles par les chloroplastes

Biosynthèse des caroténoïdes par les chloroplastes isolés, à partir d'acide mévalonique.

Nous avons d'abord voulu nous assurer que les chloroplastes isolés par la technique d'Arnon et *al.* (1956) sont capables de synthétiser les caroténoïdes à partir d'un précurseur simple : l'acide mévalonique. Nous avons donc mélangé des chloroplastes de Maïs à 2 μCi de mévalonate-2-^{14}C de potassium, en milieu tamponné, pendant 4 heures, à la lumière (4 200 lux). Le chlorure de magnésium est apporté pour maintenir l'activité de l'éventuelle acide mévalonique-kinase et le fluorure de sodium inhibe les phosphatases (Goodman et Popjak, 1960). Les expériences dont les résultats sont rapportés dans le tableau 30 nous montrent que :

— le mévalonate est incorporé dans le β-carotène, la lutéine et les autres caroténoïdes par des chloroplastes isolés en présence d'ATP.

— l'incorporation n'est pas décelable en l'absence d'ATP.

— le rendement d'incorporation du ^{14}C est très bas : de 0,02 p. 100 à 0,03 p. 100 dans la totalité des caroténoïdes en 4 heures.

Nous voyons que si l'on favorise les phosphorylations par un apport d'ATP, les chloroplastes isolés sont capables de synthétiser les caroténoïdes à partir d'unités en C_6. Sont-ils capables de métaboliser des molécules plus complexes, en C_{10} par exemple ?

Transformation du phytofluène en caroténoïdes par les chloroplastes.

D'abord nous avons cherché à déterminer les premiers caroténoïdes formés dans les chloroplastes à partir d'un tétraterpène acyclique. Au cours de la description

des méthodes, nous avons vu que nous n'avions pas pu extraire du phytoène pur, marqué au ^{14}C, à partir de racines de Carotte.

Nous avons donc fait les incubations avec des chloroplastes de Maïs et du phytofluène uniformément marqué au ^{14}C (radioactivité spécifique : 54 500 c.p.m./mg). Nous avons obtenu les résultats suivants, en présence de *Tween* 80, sans ATP (COSTES 1963 *a*) :

TABLEAU 31

Radioactivités incorporées en c.p.m. dans les caroténoïdes chloroplastiques à partir de Phytofluène ^{14}C

Temps d'incubation	Essai à la lumière (4 200 lux)				Essai à l'obscurité			
	5 heures		10 heures		5 heures		10 heures	
	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%
β-carotène	198	*16,5*	0		0		0	
Lutéine	142	*11,8*	0		155	*12,9*	305	*25,4*
Époxylutéine	0		0		0		0	
Violaxanthine	74	*6,1*	45	*3,7*	0		50	*4,2*
Néoxanthine	32	*2,6*	0		0		0	
Total des caroténoïdes	446	*37*	45	*3,7*	155	*12,9*	355	*29,6*
Radioactivité totale retrouvée	830	*69*	327	*27,2*	293	*24*	568	*47*
Phytofluène-^{14}C apporté	1 200	*100*	1 200	*100*	1 200	*100*	1 200	*100*

— le ^{14}C du phytofluène marqué se retrouve dans la lutéine, la violaxanthine, le β-carotène et la néoxanthine (tabl. 31). Les rendements d'incorporation dans les caroténoïdes (37 p. 100 — 29,6 p. 100) étant environ 1 000 fois plus élevés que ceux observés à partir du mévalonate-2-^{14}C, il est vraisemblable que la transformation du phytofluène en caroténoïdes cycliques se fait directement, sans dégradation préalable du polyène.

— les réactions de conversion observées sont enzymatiques, puisque le ^{14}C du phytofluène ne se retrouve pas dans les pigments de chloroplastes dénaturés par la chaleur (tabl. 32). En effet la *plupart* des systèmes enzymatiques sont détruits par un traitement à 90°C pendant 10 minutes.

— la transformation du phytofluène en caroténoïdes est plus lente à l'obscurité qu'à la lumière.

Ces résultats expérimentaux nous permettent de conclure que :

— le phytofluène, tétraterpène acyclique, est un précurseur des caroténoïdes cycliques ; il conduit aussi bien aux xanthophylles qu'au β-carotène.

— la lutéine peut être synthétisée indépendamment du β-carotène. Ce fait apparaît à l'obscurité (tabl. 31), mais également à la lumière où nous voyons que la synthèse de la lutéine précède celle du β-carotène (tabl. 32).

C'est la première fois qu'un précurseur nous permet de disjoindre la biosynthèse de la lutéine de celle du β-carotène.

TABLEAU 32

Radioactivités incorporées, en c.p.m, dans les caroténoïdes chloroplastiques à la lumière (4200 lux) à partir de Phytofluène ^{14}C

Temps d'incubation	Essai avec chloroplastes actifs				Essai avec chloroplastes dénaturés (10 minutes à 90° C)			
	2 heures		4 heures		2 heures		4 heures	
	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%
β-carotène	85	*2,1*	96	*2,4*	0		0	
Lutéine	2 550	*63,8*	660	*16,5*	0		0	
Époxylutéine ...	0		0		0		0	
Violaxanthine ..	0		0		0		0	
Néoxanthine ...	0		0		37*	*0,9*	0	
Total des caroténoïdes	2 635	*65,9*	756	*18,9*	37	*0,9*	0	*0*
Radioactivité totale retrouvée.	3 705	*92,6*	1 142	*28,6*	132	*3,3*	106	*2,7*
Phytofluène-^{14}C apporté	4 000	*100*	4 000	*100*	4 000	*100*	4 000	*100*

* Cette radioactivité n'est probablement pas due à la néoxanthine mais à une impureté que nous n'avons pu éliminer.

TABLEAU 33

Transformation de Lycopène ^{14}C en β-carotène et en xanthophylles dans les chloroplastes de Maïs

	Radioactivité incorporée dans les caroténoïdes à l'obscurité				Radioactivité incorporée dans les caroténoïdes à la lumière			
	2 h 30 mn		5 heures		2 h 30 mn		5 heures	
	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%
β-carotène	0	*0*	0	*0*	300	*27*	96	*8,8*
Lutéine	63	*5,7*	57	*5,2*	700	*64*	180	*16,5*
Violaxanthine ...	12	*1,1*	87	*8*	20	*1,8*	0	*0*
Lycopène ^{14}C apporté ..	1 095	*100*	1 095	*100*	1 095	*100*	1 095	*100*

Teneur en chlorophylle totale dans chaque essai : 4,46 mg.
Intensité lumineuse : 4 500 lux.
Température : 22°C ± 1°C.

TABLEAU 34

Incubation de β-carotène ^{14}C avec des chloroplastes de Maïs.

Teneur en chlorophylle : 4,2 mg dans 15 ml de suspension. *Tween* 80 : 0,08 ‰
Température : 20 à 23°C ; pH = 7,05. Lumière : 4 000 lux.
Radioactivité spécifique du β-carotène : $8{,}05.10^3$ c.p.m/µg.

	Obscurité						Lumière					
	5 heures			12 heures			5 heures			12 heures		
	Teneurs en µg	Radioactivités incorporées		Teneurs en µg	Radioactivités incorporées		Teneurs en µg	Radioactivités incorporées		Teneurs en µg	Radioactivités incorporées	
		c.p.m.	%		c.p.m.	%		c.p.m.	%		c.p.m.	%
Lutéine	193	511	*1,28*	191	261	*0,65*	168	218	*0,54*	148,3	1 900	*4,75*
Époxylutéine	12,2	0		9,2	36		8,4	0		4,3	52	
Violaxanthine	9,8	45		23,3	24		10,4	37		13,5	60	
Néoxanthine	3,4	0		14,1	39		4	18		4,2	58	
Xanthophylles totales	218,4	556	*1,39*	237,6	360	*0,9*	190,8	273	*0,68*	170,3	2 070	*5,2*
β-carotène retrouvé	135,5	38 000	*95*	101,4	34 200	*85,4*	79,3	37 500	*93,6*	41,2	31 700	*79*
Total des caroténoïdes	353,9	38 556		339	34 560		270,1	37 773		211,5	33 770	
Radioactivité totale retrouvée		39 063			35 423			38 455			34 950	
β-carotène ^{14}C apporté	4,7	40 000	*100*	4,7	40 000	*100*	4,7	40 000	*100*	4,7	40 000	*100*

Transformation du lycopène en caroténoïdes par les chloroplastes.

A partir de lycopène uniformément marqué au ^{14}C (radioactivité spécifique : 3 250 c.p.m./mg) nous obtenons les mêmes résultats qu'avec le phytofluène : le lycopène peut être cyclisé pour se transformer en β-carotène ou en xanthophylles (tabl. 33). Ce fait n'est qu'une confirmation des expériences de Decker et Ueheleke (1961) et de Godnev et Rotfarb (1962).

Nous observons également une synthèse de lutéine et de violaxanthine indépendante de celle du β-carotène.

Ne disposant pas de neurosporène marqué, ni d'une quantité suffisante de ζ carotène radioactif pur, nous n'avons pas eu la possibilité d'éprouver le caractère précurseur de ces polyènes acycliques pour les xanthophylles.

Mais le fait que le phytofluène et le lycopène puissent être transformés indifféremment en β carotène ou en lutéine nous conduit à penser que c'est au niveau des tétraterpènes acycliques que les voies de biosynthèse de ces deux pigments se séparent. *Même si la lutéine peut résulter de l'oxydation du β-carotène comme l'a suggéré* Claes (1959), *elle peut, par ailleurs, être directement synthétisée à partir d'un précurseur acyclique.*

Nous avons cependant voulu vérifier si les carotènes peuvent être oxydés enzymatiquement en xanthophylles.

Transformation de carotènes en xanthophylles

Du β-carotène radioactif, synthétisé par des feuilles, recristallisé, a été soumis à l'action de suspensions de chloroplastes de Maïs et de Tomate. Dans les tableaux 34 et 35 nous avons rassemblé les résultats :

— le ^{14}C du β-carotène se retrouve dans les xanthophylles : le rendement de cette transformation est plus élevé à la lumière (5,2 p. 100) qu'à l'obscurité (0,9 p. 100) ;

— les premières xanthophylles où apparaît la radioactivité du β-carotène sont la violaxanthine et la lutéine. Nous n'avons pas pu isoler la zéaxanthine en quantité suffisante pour la caractériser ;

— la transformation du β-carotène en lutéine est enzymatique, puisqu'elle ne se produit plus avec des chloroplastes dénaturés par la chaleur (tabl. 35). Pour les autres caroténoïdes, principalement la violaxanthine, nous ne pouvons pas affirmer que la réaction de conversion soit enzymatique.

Ces expériences semblent établir que le système enzymatique complet de chloroplastes non lavés peut transformer le β-carotène en lutéine. Cependant nous devons observer que la plus grande partie du β-carotène (4,7 µg) n'a pas réagi : comparés à ceux observés à partir du phytofluène les rendements de conversion sont faibles. Il est possible que l'isomérisation β → α, associée à l'oxydation dans cette transformation β-carotène → lutéine soit la cause de la lenteur de la réaction.

Pour vérifier cette interprétation nous avons essayé d'incuber de l'α-carotène marqué au-^{14}C avec des chloroplastes. Dans les mêmes conditions expérimentales qu'avec le β-carotène ^{14}C nous avons observé que (tabl. 36) :

- l'α-carotène peut être transformé en lutéine. La néoxanthine est également marquée ;

— cette réaction est enzymatique.

TABLEAU 35

Incorporation de β-carotène ^{14}C dans les caroténoïdes des chloroplastes de Tomate
(Test de réaction enzymatique).

Température : 20° ± 2°C.
Lumière : 4 500 lux pendant 5 h 30 mn. Radioactivité spécifique du β carotène : 100,5 c.p.m./μg.
Chloroplastes dénaturés : 10 mn à 80°C.
Teneur en chlorophylle : 1,2 mg dans 10 ml de suspension.

	Chloroplastes actifs			Chloroplastes dénaturés		
	Teneurs en μg de pigment	Radioactivités incorporées		Teneurs en μg de pigment	Radioactivités incorporées	
		c.p.m.	%		c.p.m.	%
β-carotène retrouvé	9,7	780	*21*	14,6	1 020	*27,6*
Lutéine	23,9	22	*0,6*	22	0	*0*
Autres xanthophylles (teneurs exprimées en lutéine)	4,2	62	*1,7*	7,7	58	*1,6*
Total des caroténoïdes	37,8	864		44,3	1 078	
Radioactivivité retrouvée		1 098	*29,6*		1 293	*35*
β-carotène ^{14}C apporté	37	3 700	*100*	37	3 700	*100*

TABLEAU 36

Transformations d'α-carotène ^{14}C par les chloroplastes de Maïs.

Température = 21° ± 2°C.
Lumière = 4 500 lux pendant 4 heures. Radioactivité spécifique de l'α-carotène : 11,75 c.p.m./μg.
Teneur en chlorophylle : 1,93 mg dans 11 ml de suspension.

	Chloroplastes actifs			Chloroplastes dénaturés (10 mn à 80°C)		
	Teneurs en μg	Radioactivités incorporées		Teneurs en μg	Radioactivités incorporées	
		c.p.m.	%		c.p.m.	%
β-carotène	37,7	31*	*6,8*	42,3	0	
Lutéine	79,7	173	*38,5*	88	0	
Époxylutéine	7,8	0	*0*	5	0	
Violaxanthine	13,3	0	*0*	9	0	
Néoxanthine	13,3	76	*16,9*	11	0	
Radioactivité retrouvée		320	*71*		78	*17,3*
α-carotène ^{14}C apporté	38	450	*100*	38	450	*100*

(*) La faible radioactivité retrouvée dans le β-carotène peut être due à une contamination par de l'α carotène ^{14}C.

Nous ne sommes pas sûr que la radioactivité qui apparaît dans le β-carotène ne soit pas due à des traces d'α-carotène. En effet, dans la séparation chromatographique l'α- et le β-carotène sont très voisins et une contamination du β carotène par l'α-carotène ^{14}C apporté n'est pas à exclure.

Nous ne pouvons pas conclure à une transformation de l'α-carotène en β-carotène. Mais il apparaît nettement que l'*oxydation d'α-carotène en lutéine se fait avec un rendement plus élevé (38 p. 100) que celle du β-carotène en lutéine (1 p. 100 au maximum daus le même temps)*.

Ces résultats expérimentaux, obtenus par la technique des traceurs radioactifs confirment les conclusions auxquelles était parvenu Claes (1959) après un travail sur les caroténoïdes de certains mutants de *Chlorella : la lutéine peut dériver des carotènes par oxydation.*

Or nous avons vu que *la lutéine peut être synthétisée à partir des tétraterpènes acycliques, indépendamment du β-carotène.* Par ailleurs, à partir de précurseurs lointains du métabolisme, nous avons pu, dans certaines conditions expérimentales, obtenir des xanthophylles avec une radioactivité spécifique supérieure à celle du β-carotène, ce qui permet de penser qu'un *carotène peut dériver d'une xanthophylle.* Il y a une contradiction entre ces deux dernières observations et le résultat que nous venons d'obtenir qui montre que les carotènes sont des précurseurs de la lutéine. Il est permis de se demander si les rapports entre carotènes et xanthophylles se ramènent seulement à une oxydation des hydrocarbures en alcool, et si les réactions de réduction des xanthophylles en β-carotène, dont nous avons suggéré la possibilité, correspondent à une réalité.

Transformation des xanthophylles par les chloroplastes isolés

Pour essayer de résoudre le problème que nous venons de poser, nous avons soumis des préparations de xanthophylles radioactives, en suspension dans le *Tween* 80, à l'activité enzymatique de chloroplastes extraits de feuilles de Tomate ou de Maïs (Costes, 1963 *c*).

La lutéine.

Les incubations de lutéine uniformément marquée au ^{14}C en présence de chloroplastes ont donné les résultats suivants (tabl. 37) :

— parmi les caroténoïdes, le ^{14}C de la lutéine se retrouve uniquement dans l'époxylutéine et dans le β-carotène ;

— le rendement de ces transformations est relativement élevé (3 p. 100 à 33 p. 100), très supérieur au rendement d'incorporation du mévalonate-2-^{14}C dans les caroténoïdes dans les mêmes conditions : les réactions impliquées ne supposent donc pas la dégradation préalable des chaînes carbonées en ^{14}C ;

— l'apparition de radioactivité dans le β-carotène se fait à la lumière et non à l'obscurité ; cette réaction met en jeu un système enzymatique présent dans les chloroplastes, comme le montre l'absence de transformation avec des chloroplastes dénaturés ;

— l'apparition du ^{14}C dans l'époxylutéine n'est pas nécessairement due à une réaction enzymatique. Elle est cependant fortement accélérée avec des chloroplastes actifs ;

— dans aucun cas la radioactivité n'est apparue dans la violaxanthine ou dans la néoxanthine.

L'interprétation de ces faits peut se résumer ainsi :

— *la lutéine se transforme enzymatiquement en β-carotène suivant une réaction favorisée par la lumière.* Cette réaction comporte obligatoirement une réduction des fonctions alcool :

$$4\ (H) + \text{lutéine} \longrightarrow 2H_2O + \beta\ \text{carotène}$$

— *la lutéine s'oxyde facilement en époxylutéine.* Nous avons vérifié que cette oxydation se produit très facilement à l'air ou en solution.

TABLEAU 37

Transformation enzymatique de lutéine ^{14}C
(Radioactivités incorporées en coups par minute)

	Chloroplastes de Maïs				Chloroplastes de Tomate							
	Obscurité (12 heures)		Lumière (12 heures)		Obscurité (5 heures)		Lumière (5 heures)		Lumière (7 heures)			
									chloroplastes actifs		chloroplastes dénaturés(1)	
	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%
β-carotène	0	*0*	36	*6,5*	0	*0*	44	*3,4*	360	*33,3*	0	*0*
Violaxanthine ...	0	*0*	0	*0*	—		—		0	*0*	0	*0*
Époxylutéine	0	*0*	31	*5,6*	21	*1,4*	24	*1,8*	316	*29,2*	30	*2,8*
Néoxanthine	0	*0*	0	*0*	—		—		0	*0*	0	*0*
Radioactivité retrouvée .	285	*52*	291	*53*	770	*51,5*	1 117	*86*	853	*79*	523	*48,4*
Lutéine ^{14}C apportée ..	550	*100*	550	*100*	1 500	*100*	1 300	*100*	1 080	*100*	1 080	*100*

(1) Chloroplastes dénaturés par chauffage à 90°C pendant 10 minutes.

La violaxanthine.

La violaxanthine est quantitativement la seconde xanthophylle des feuilles et nous avons cherché à décrire ses réactions en présence de chloroplastes. Les résultats figurant dans le tableau 38 nous montrent que (dans les mêmes conditions expérimentales que pour les expériences précédentes) :

— *la violaxanthine se transforme principalement en β-carotène* à la lumière comme à l'obscurité ;

— *la violaxanthine peut donner naissance à l'époxylutéine et à la lutéine.* Cette dernière réaction est cependant bien moins rapide que la transformation en β-carotène ;

— toutes ces réactions sont enzymatiques.

Il est possible que la violaxanthine puisse également donner naissance à la néoxanthine.

Nous confirmons ainsi les résultats obtenus, en même temps que nous, par SAAKOV (1963) avec des techniques entièrement différentes, sur des chloroplastes isolés de feuilles de Fève.

Nous voyons que la violaxanthine peut être réduite de deux façons : complètement en donnant du β-carotène, ou graduellement, par perte d'oxygène, conduisant à l'époxylutéine et à la lutéine. Dans ce dernier cas, il y a isomérisation de structure β → α. Dans le premier cas, un intermédiaire possible est la zéaxanthine : c'est ce que nous avons voulu vérifier avec de la zéaxanthine marquée au ^{14}C.

TABLEAU 38

Transformation enzymatique de violaxanthine ^{14}C
(Radioactivités incorporées en coups par minute)

	Chloroplastes de Maïs				Chloroplastes de Tomate					
							Lumière (6 heures)			
	Obscurité (10 heures)		Lumière (10 heures)		Lumière (4 h 30 mn)		chloroplastes actifs		chloroplastes dénaturés (1)	
	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%
β-carotène	495	*24,8*	280	*14*	55	*36,7*	96	*23,2*	0	*0*
Lutéine	62	*3,1*	52	*2,6*	24	*16*	26	*6,2*	0	*0*
Époxylutéine	40	*2*	45	*2,2*	12	*8*	7	*1,7*	0	*0*
Néoxanthine	8	*0,4*	24	*1,2*	—		0	*0*	0	*0*
Radioactivité retrouvée	1 628	*81,3*	1 151	*57,5*	127	*84,6*	—			
Violaxanthine ^{14}C apportée	2 000	*100*	2 000	*100*	150	*100*	415	*100*	415	*100*

(1) Chloroplastes dénaturés par chauffage à 90°C pendant 6 minutes.

La zéaxanthine.

Préparée à partir de fruits de *Physalis franchetii* alimentés avec de l'acétate-2-^{14}C de sodium, purifiée par cristallisation, la zéaxanthine uniformément marquée au ^{14}C a été incubée avec des chloroplastes de Maïs. L'apparition de ^{14}C dans les autres caroténoïdes à partir de la zéaxanthine (tabl. 39) permet de tirer les conclusions suivantes :

— *la zéaxanthine peut se transformer enzymatiquement en β-carotène* à la lumière et à l'obscurité ;

— *la zéaxanthine peut s'oxyder en violaxanthine :* cette réaction n'est pas nécessairement enzymatique et semble plus rapide que la transformation en β-carotène. Elle peut se produire en l'absence de toute catalyse enzymatique ;

— dans une faible mesure la zéaxanthine peut s'oxyder en néoxanthine, enzymatiquement, à la lumière. La violaxanthine étant plus fortement radioactive, il est possible qu'elle soit un intermédiaire précurseur de la néoxanthine.

— Il ne semble pas qu'une isomérisation directe zéaxanthine → lutéine, soit possible. En effet, dans les expériences où nous avons soigneusement séparé la lutéine de la zéaxanthine-^{14}C, nous n'avons pas retrouvé de radioactivité significative dans la lutéine.

Nous voyons que la zéaxanthine se comporte comme la lutéine :

— oxydation non enzymatique, en violaxanthine dans un cas, en époxylutéine dans l'autre ;

TABLEAU 39

Transformation enzymatique de zéaxanthine ^{14}C
(Radioactivités incorporées en coups par minute).
Chloroplastes de Maïs : 5 mg de chlorophylle dans 21,5 ml de suspension.
Radioactivité spécifique de la zéaxanthine ^{14}C : 84,1 c.p.m./µg.

	Obscurité				Lumière (4500 lux)				Lumière pendant 5 heures (4500 lux)			
	4 heures		7 heures		4 heures		7 heures		Chloroplastes actifs		Chloroplastes dénaturés (1)	
	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%	c.p.m.	%
β-carotène	66	*1,6*	0	*0*	0	*0*	117	*2,9*	37	*1,5*	0	*0*
Violaxanthine	116	*2,9*	178	*4,4*	168	*4,2*	208	*5,2*	46	*1,8*	30	*1,2*
Lutéine	—		—		—		—		0	*0*	0	*0*
Zéaxanthine	3 620	*90,5*	2 690	*67,3*	3 300	*82,5*	2 280	*57*	500	*20*	700	*28*
Néoxanthine.....	0	*0*	0	*0*	28	*0,7*	63	*1,5*	21	*0,8*	0	*0*
Total des caroténoïdes..	3 802	*95*	2 868	*71,7*	3 496	*87,4*	2 668	*66,6*	604	*24,1*	730	*29,2*
Radioactivité retrouvée ..	3 996	*100*	3 147	*78,5*	3 662	*91,6*	2 849	*71,3*	804	*32,2*	914	*36,6*
Zéaxanthine ^{14}C apportée .	4 000	*100*	4 000	*100*	4 000	*100*	4 000	*100*	2500	*100*	2 500	*100*

(1) Chloroplastes dénaturés par un traitement de 10 mn à 90°C.

— réduction en β-carotène. Cependant la lumière est nécessaire à la réduction de la lutéine et comme dans le cas de la violaxanthine, elle ne semble pas indispensable à la réduction de la zéaxanthine.

Remarque.

Les résultats expérimentaux obtenus par des incubations de caroténoïdes radioactifs proviennent de mesures de radioactivités aussi faibles que 20 coups par minute. Une double difficulté technique explique les basses radioactivités retrouvées dans les produits séparés après incubation :

— on ne peut pas obtenir les caroténoïdes radioactifs, synthétisés par voie biologique, avec des radioactivités spécifiques aussi élevées que les produits résultant

d'une synthèse organique, comme l'acide acétique ou l'acide mévalonique marqués. Les précurseurs incubés sont donc peu radioactifs.

— on ne peut pas mettre en suspension homogène des quantités de pigment supérieures à environ 100 µg en présence de chloroplastes.

Jusqu'à présent ces mesures n'étaient pas usuelles dans l'application de la technique des traceurs en biochimie car on ne disposait pas de compteurs de radioactivité ayant une faible dispersion statistique des comptages. Au cours de l'exposé des méthodes, nous avons montré que les mesures de basses radioactivités sont physiquement significatives jusqu'à 7 coups par minute dans le cas du ^{14}C, avec la technique que nous employons.

Il reste à savoir si ces radioactivités sont chimiquement significatives et ne sont pas dues à la contamination des caroténoïdes par des impuretés radioactives. D'une part, nous avons procédé à des purifications par des chromatographies sur colonne aussi poussées que dans les expériences avec des précurseurs fortement radioactifs ($^{14}CO_2$ et $^{14}CH_3$—COONa). D'autre part, dans les expériences avec des xanthophylles marquées, par exemple, nous n'avons jamais trouvé de radioactivité dans le β-carotène après des incubations avec des chloroplastes dénaturés. Donc, dans l'hypothèse d'une impureté contaminant le β-carotène il faut admettre :

— que cette impureté résulte d'une dégradation *enzymatique* des xanthophylles, et qu'il s'agit d'un produit oxydé ;

— que cette substance oxydée a un comportement chromatographique identique ou très voisin de celui du β-carotène à la fois sur colonne d'Al_2O_3 et sur colonne de $Ca(OH)_2$;

— qu'on ne peut la détecter par microchromatographie, c'est-à-dire que sa teneur dans le β-carotène extrait et purifié est inférieure à 0,05 µg ; soit au plus 5/1 000 de la masse du pigment, dans les plus mauvaises conditions.

La concordance de ces conditions nous semble peu probable et nous pensons que les radioactivités mesurées, même faibles, sont réellement imputables aux pigments.

Nous avons donc mis en évidence les réactions d'oxydation des xanthophylles. Mais, par leur caractère inattendu, les réactions les plus remarquables sont celles qui transforment les xanthophylles en β-carotène. Ces réactions supposent une réduction, que nous avons essayé d'observer en suivant le tritium venant de l'eau tritiée, dans les caroténoïdes des feuilles.

III. — Répartition de ^3H entre les caroténoïdes foliaires, a partir d'eau tritiée

Eau tritiée métabolisée par des folioles de Tomate

Dans les mêmes temps (de 1 h à 7 h) et dans les mêmes conditions d'éclairement que pour les photosynthèses en présence de $^{14}CO_2$, nous avons donné de l'eau tritiée à des folioles de Tomate, par la technique de flottage. Les résultats rapportés dans le tableau 40 peuvent être classés et analysés de la façon suivante.

Le tritium de l'eau se retrouve dans les caroténoïdes. Mais la radioactivité qui apparaît en 7 heures d'incorporation continue dans les caroténoïdes est plus forte à la

TABLEAU 40

Incorporation du tritium à partir de ^3H_2O dans les caroténoïdes des feuilles de Tomate à la lumière et à l'obscurité

Tomates âgées de 3 mois : 4 feuilles dont on utilise 1 foliole terminale (environ 200 mg de matière fraîche). Matière sèche : 14,8 p. 100.
Pétiole plongeant dans solution radioactive 1,43 mCi/ml.
Obscurité, 1 heure, suivie de l'éclairement : 15 000 lux. Température : 30°C ± 1°C.

	Lumière								Obscurité			
	1 heure		2 heures		7 heures				7 heures			
						Radioactivités				Radioactivités		
	Teneurs en µg/g de foliole	Radioactivités (c.p.m./g de foliole)	Teneurs en µg/g de foliole	Radioactivités (c.p.m./g de foliole)	teneurs en µg/g de foliole	c.p.m./g de foliole	pourcentages insaponifiable	pourcentages du total	teneurs en µg/g de foliole	c.p.m./g de foliole	pourcentages de l'insaponifiable	pourcentages du total
β-carotène	92	1 215	104	2 165	111	7 992	*18,3*	*0,69*	87	0	*0*	*0*
Lutéine	88,6	1 120	97,2	727	129	2 240	*5,1*	*0,19*	73,8	446	*34,2*	*0,85*
Zéaxanthine	17	—	24,3	970	38,4	1 375	*3,1*		2,2	—	—	—
Époxylutéine	11,9	410	14,3	553	15,4	10 300	*23,5*	*0,89*	3,5	75	*5,7*	
Violaxanthine + Auroxanthine	14,6	550	16,9	666	17,5	887	*2*		20,3	99	*7,6*	
Néoxanthine.....	15,9	467	24,3	666	32,7	801	*2*		20,2	107	*8,1*	
Total des caroténoïdes.....	240	3 762	281	5 747	344	23 595	*54*	*2*	207	727	*55,6*	*1,39*
Insaponifiable ..		6 753		10 190		43 784	*100*	*3,8*		1 305	*100*	*2,5*
Radioactivité totale fixée						1 159 800		*100*		52 300		*100*
Volume d'eau absorbée	~ 0,2 ml		~ 0,4 ml		~ 1,4 ml				~ 0,1 ml			

lumière (23 595 c.p.m./g de foliole) qu'à l'obscurité (727 c.p.m./g de foliole) : cette différence dans le marquage des pigments pourrait venir du fait que les folioles ont absorbé seulement à l'obscurité 4,5 p. 100 de l'eau qu'elles ont absorbée à la lumière. Mais nous constatons que la proportion du tritium incoporé dans les caroténoïdes est plus grande à la lumière qu'à l'obscurité : 2 p. 100 de la radioactivité totale fixée au lieu de 1,39 p. 100 (tabl. 40). Nous retrouvons ici un résultat bien mis en évidence à partir de l'ion acétate : *la lumière favorise la caroténogenèse.*

Il faut également noter que la proportion de ^{3}H fixé dans les caroténoïdes à partir de $^{3}H_2O$ est plus faible (2 p. 100 en 7 heures) que celle de ^{14}C à la lumière à

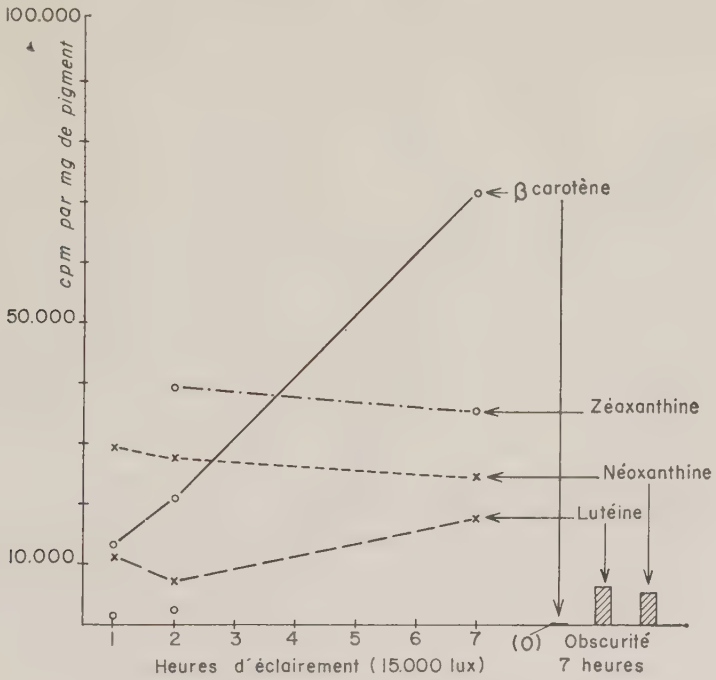


FIG. 44. — *Évolution, à la lumière, de la radioactivité spécifique des caroténoïdes de la feuille de Tomate, à partir de $^{3}H_2O$*

partir de $^{14}CO_2$ (1,8 p. 100 en 2 heures) : ce fait est normal si nous considérons que dans ces conditions la quantité de tritium incorporée dans une substance reflète le nombre et la vitesse des réactions de réduction intervenant dans la biosynthèse de cette substance. En effet, nous avons vu que la biosynthèse du squelette tétraterpénique met en jeu principalement des déshydrogénations et seulement une réduction : celle de l'acide β-méthyl β-hydroxyglutarique en acide mévalonique (tabl. 3).

Dans le groupe des caroténoïdes, la radioactivité n'est pas uniformément répartie. A l'obscurité, au bout de 7 heures, seules les xanthophylles sont radioactives : le β-carotène n'est pas marqué (tabl. 40). A la lumière, la radioactivité du tritium dans les caroténoïdes augmente avec le temps : mais si *la radioactivité incorporée dans le β-carotène et dans l'époxylutéine augmente très vite, elle varie beaucoup moins vite dans les autres pigments* (tabl. 40). Sur la figure 44 nous voyons qu'au début de l'éclairement la radioactivité spécifique du β-carotène est voisine de celle de la lutéine

et inférieure à celle de la zéaxanthine, puis elle augmente très fortement. Dans une autre série d'expériences, où la radioactivité fournie aux feuilles est moins grande, le tritium n'est pas décelable après 3 heures d'éclairement dans le β-carotène et n'y apparaît qu'au bout de 7 heures. Et si l'on examine les variations du rapport de la radioactivité spécifique (R.S.) du β-carotène à celle de la lutéine ou de la zéaxanthine, il semble que le tritium s'accumule dans le β-carotène à la lumière :

	1re série d'essais			2e série d'essais		
Durée d'éclairement des feuilles en présence de ^3H_2O (15 000 lux)	1 h	3 h	7 h	1 h	2 h	7 h
$\frac{\text{R.S. β-carotène}}{\text{R.S. lutéine}}$	0	0	0,42	1,05	2,78	4,15
$\frac{\text{R.S. β-carotène}}{\text{R.S. zéaxanthine}}$	0	0	0,49		0,52	2

En effet, ce rapport augmente en fonction du temps. Ce fait signifie que *par rapport à ce qui se passe pour les xanthophylles, l'accumulation de tritium dans le β-carotène est tardive, mais préférentielle.* Or, nous avons vu que le squelette carboné du β-carotène est rapidement synthétisé dans les feuilles (tabl. 12 à 16) et cependant ^3H n'y apparaît pas en premier mais se fixe d'abord dans la zéaxanthine et dans la lutéine. Pour expliquer cette contradiction, nous pouvons admettre que ^3H s'intègre d'abord dans les xanthophylles sous une forme inexistante dans le β-carotène, la forme OH, et peut-être par échange isotopique ; par la suite, à la lumière, une redistribution du tritium par le métabolisme, lors de la réduction du β-hydroxy-β-méthylglutarate en mévalonate, entraînerait son incorporation dans le β-carotène.

Afin de vérifier la validité de cette interprétation, nous avons cherché si la réduction observée dans la biosynthèse du β-carotène disparaît dans les conditions où cette biosynthèse est impossible à partir de l'acide mévalonique.

Incubation d'eau tritiée en présence de chloroplastes

Nous avons essayé de mettre en évidence cette réduction en mélangeant à des chloroplastes de Tomate une forte radioactivité d'eau tritiée (150 μCi), à la lumière, en milieu tampon phosphate (pH 7,1) mais sans ATP ni autre cofacteur : nous avons vu que dans ces conditions l'acide mévalonique n'est pas incorporé dans les caroténoïdes (tabl. 30). Nous avons comparé la radioactivité dans le β-carotène avec des chloroplastes actifs ou avec des chloroplastes dénaturés par la chaleur. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 41 et indiquent nettement :

— qu'il apparaît une radioactivité dans le β-carotène des chloroplastes dénaturés : elle est probablement due à l'échange isotopique entre ^1H et ^3H dans la chaîne polyénique. Il n'est cependant pas à exclure que la radioactivité ici apparue soit due à une dénaturation incomplète des systèmes enzymatiques à 75°C ;

— qu'avec les chloroplastes actifs la radioactivité spécifique du β-carotène est au moins 2 fois plus élevée lorsque la durée d'incubation dépasse 1 heure. Cette apparition de tritium dans les molécules de β-carotène résulte d'une réaction de réduction. Cette réaction se produit même en l'absence de biosynthèse de β-carotène à partir de l'acide mévalonique.

TABLEAU 41

Incorporation de ^3H_2O dans le β-carotène de chloroplastes de Tomate à la lumière
^3H_2O : 150 μCi.
Lumière : 4 200 lux. Température = 23°C.

Temps d'éclairement		30 mn	60 mn	90 mn
Teneurs en β-carotène en mg dans 12 ml	chloroplastes actifs	0,042	0,038	0,025
	chloroplastes dénaturés(*)	0,045	0,045	0,045
Radioactivités spécifiques en c.p.m./mg	chloroplastes actifs	6 550	38 400	63 500
	chloroplastes dénaturés	7 460	20 500	24 500
Radioactivités incorporées en c.p.m.	chloroplastes actifs	275	1 460	1 590
	chloroplastes dénaturés	340	935	1 100

(1) Chloroplastes dénaturés par traitement 10 mn à 75° C.

Il y a donc bien une réaction enzymatique de réduction dans une voie de biosynthèse du β-carotène, en dehors de la réduction du β-hydroxy-β-méthylglutarate en mévalonate. Comme la synthèse de la chaîne polyénique se fait par déshydrogénations successives, la fixation d'hydrogène observée peut correspondre à la réduction des xanthophylles en β-carotène.

Pour vérifier ce point nous avons imaginé deux types d'expériences.

Nous avons d'abord voulu, dans des chloroplastes isolés de feuilles de Tomate, comparer l'évolution à la lumière de la radioactivité du tritium dans le β-carotène et dans la lutéine. Nous avons utilisé un mélange réactionnel sensiblement identique à celui dont nous nous sommes servi pour incuber les caroténoïdes radioactifs, soit :

	ml
Tween 80 0,5 p. 1000	9
Acétone	1
Suspension des chloroplastes	11 (tampon phosphate pH 7,1)
^3H_2O	0,3
Volume réactionnel	21,3 contenant 3,98 mg de chlorophylle

L'éclairement est de 4 200 lux et la température de 20°C ± 1. Les courbes de la figure 45 représentent les résultats obtenus : la radioactivité spécifique de la lutéine augmente très peu alors que celle du β-carotène d'abord inférieure à celle de la lutéine s'élève ensuite fortement. *Comme dans les feuilles entières, le tritium s'accumule préférentiellement dans le β-carotène des chloroplastes.*

Dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons alors cherché si l'apport d'une xanthophylle à la suspension de chloroplastes peut augmenter l'apparition de

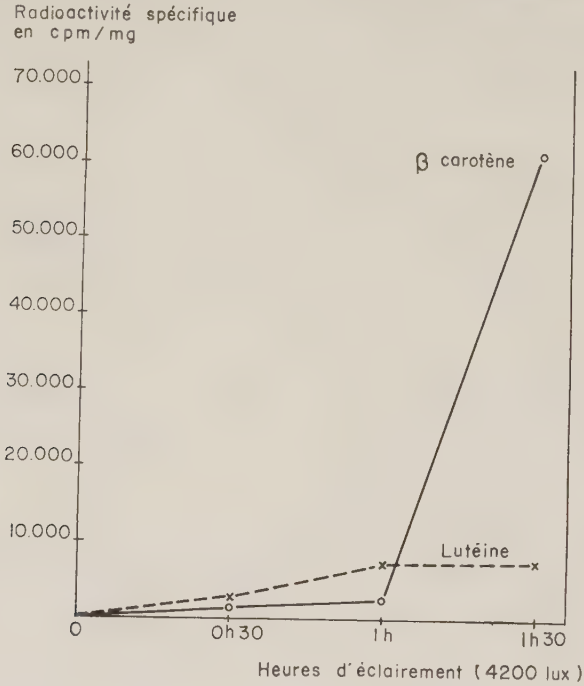


FIG. 45. — *Incorporation de ^3H, à partir ^3H_2O dans le β-carotène et dans la lutéine de chloroplastes isolés de feuilles de Tomate. Milieu : tampon phosphate pH = 7,1*

tritium dans le β-carotène à partir d'eau tritiée, en milieu tamponné. Les résultats obtenus sont rassemblés ci-dessous dans le tableau 42 :

TABLEAU 42

Incorporation de ^3H à partir de ^3H_2O dans le β-carotène de chloroplastes de Tomate en présence de zéaxanthine.

		Essai 1	Essai 2
Durée d'éclairement (4 200 lux)		0 h 30 mn	1 h
Chloroplastes témoins (^3H_2O : 150 μCi)	mg de β-carotène	0,0688	0,0241
	Radioactivité spécifique (c.p.m./mg de pigment)	1 407	6 400
	Radioactivité incorporée (c.p.m.)	96	154
Chloroplastes + Zéaxanthine (^3H_2O : 150 μCi)	mg de β-carotène	0,0624	0,0157
	Radioactivité spécifique (c.p.m./mg de pigment)	15 080	12 720
	Radioactivité incorporée (c.p.m.)	940	200
	Zéaxanthine ajoutée, mg	0,040	0,020

Nous voyons qu'en présence de zéaxanthine la radioactivité spécifique du β-carotène tritiée est au moins doublée. Cela signifie que la *zéaxanthine favorise l'apparition d'hydrogène dans le β-carotène*. Comme, par ailleurs, nous avons vu que la zéaxanthine peut se transformer en β-carotène, il est très probable que la réduction observée corresponde à une réduction de la zéaxanthine en β-carotène. Nous devons, par ailleurs noter que dans toutes nos expériences, l'adjonction de zéaxanthine aux suspensions de chloroplastes provoque une diminution de la quantité de β-carotène. Il est vraisemblable qu'il s'agit d'une dégradation accélérée du β-carotène à la lumière en présence de zéaxanthine : nous comprenons mal ce fait.

Cependant notre conclusion ne laisse guère de doutes : les expériences réalisées avec des chloroplastes isolés nous ont permis d'associer la réduction qui apparaît dans les étapes terminales de la biosynthèse du β-carotène à la réduction d'une xanthophylle en β-carotène.

Remarque

Dans les expériences d'incubation de xanthophylles marquées au ^{14}C avec des chloroplastes, nous avons observé que la violaxanthine et la zéaxanthine pouvaient être réduites en β-carotène à l'obscurité. Il est permis de se demander d'où vient l'agent réducteur, en l'absence de lumière, dans les chloroplastes. Nous avons calculé que nous avons introduit, au maximum, dans les suspensions de chloroplastes :

— 0,04 micromole de violaxanthine dont seulement 0,01 micromole a été réduite en β-carotène à l'obscurité ;

— 0,08 micromole de zéaxanthine dont au plus 0,002 micromole a été transformée en β-carotène à l'obscurité.

Supposons que le réducteur en cause soit $NADPH_2$. La réduction de 1 molécule de ces xanthophylles en 1 molécule de β-carotène doit impliquer la fixation de 4 atomes d'hydrogène, donc par exemple, la mobilisation de 2 molécules de $NADPH_2$. Dans nos expériences il aura donc fallu au plus 0,02 micromole de $NADPH_2$ pour réduire la violaxanthine et 0,004 micromole de ce réducteur pour réduire la zéaxanthine. Les suspensions de chloroplastes que nous avons utilisées ne contenaient jamais moins de 4 mg de chlorophylle. Par ailleurs, nous n'avons pas lavé le culot de centrifugation des chloroplastes, afin de ne solubiliser aucun système enzymatique. Dans ces conditions, la quantité de photoréducteur *préexistant dans les chloroplastes* avant les expériences, est suffisante pour rendre compte de la réduction des xanthophylles, en l'absence de lumière.

IV. — Conclusions sur le métabolisme des caroténoïdes

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons étudié expérimentalement les possibilités réactionnelles des caroténoïdes.

La cyclisation

Nous avons d'abord montré que *la cyclisation du phytofluène ou du lycopène, suivant un mécanisme que nous ne connaissons pas, conduit indifféremment au β-carotène ou à la lutéine*. C'est donc probablement au niveau des tétraterpènes acycliques

que se produit l'hydroxylation. Dans le fruit de la Tomate, au cours de la préparation de lycopène marqué au ^{14}C à partir de $^{14}CH_3COONa$, nous avons obtenu des radioactivités spécifiques dans la lycophylle (7 200 c.p.m./mg) et dans la lutéine (5 100 c. p. m./mg) supérieure à celle du lycopène (3 250 c.p.m./mg) : le lycopène ne peut donc pas être le précurseur direct de ces xanthophylles. *Si l'hydroxylation est possible à partir du lycopène elle peut intervenir également sur un polyène plus saturé.* L'éclaircissement du mécanisme de l'hydroxylation à ce niveau (Davies, 1962) demande encore beaucoup d'expérimentation, mais nous pouvons déjà écrire sans préjuger des intermédiaires :

$$\beta \text{ carotène} \longleftarrow (\text{ Caroténoïde acyclique en } C_{40}) \longrightarrow \text{lutéine} \quad (1)$$

Les réactions d'oxydation des caroténoïdes

Nous avons également mis en évidence des réactions d'oxydation.

— *D'abord l'oxydation enzymatique des carotènes* que nous pouvons formuler ainsi puisque l'on sait que les OH de la lutéine viennent de l'oxygène de l'air (Yamamoto et *al.*, 1962 *b*).

$$\begin{cases} \beta \text{ carotène} + 2\ (O) \longrightarrow \text{lutéine} \quad (2) \\ \alpha \text{ carotène} + 2\ (O) \longrightarrow \text{lutéine} \quad (3) \end{cases}$$

Nous avons vu que le rendement de la réaction (2) est faible, ce qui permet de penser que cette isomérisation $\beta \rightarrow \alpha$ ne se fait pas directement.

— *Les réactions d'oxydation des xanthophylles ne sont probablement pas enzymatiques.* Nous avons mis en évidence les réactions suivantes :

$$\text{zéaxanthine} + 2\ (O) \longrightarrow \text{violaxanthine} \quad (4)$$
$$\text{lutéine} + (O) \longrightarrow \text{époxylutéine} \quad (5)$$

Le caractère spontané de ces réactions est normal : le cycle époxydique se crée aisément sur les cyclooléfines (Cvetanović, 1958) et d'autant plus facilement qu'il peut se conjuguer avec un groupe insaturé voisin (Parker et Isaacs, 1959).

Les réactions de réduction

Les réactions de réduction que nous avons démontrées par la technique des traceurs radioactifs se ramènent à deux types. Elles sont toutes enzymatiques.

— *Il y a d'abord la réduction des époxydes de xanthophylle par perte d'un ou de plusieurs atomes d'oxygène :*

$$\text{violaxanthine} \longrightarrow \text{époxylutéine} + (O) \quad (6)$$
$$\text{violaxanthine} \longrightarrow \text{lutéine} + 2\ (O) \quad (7)$$

Ces réactions de la violaxanthine s'accompagnent d'une isomérisation $\beta \rightarrow \alpha$. La réaction (6), comme la réaction (5), donnent naissance à l'époxylutéine : ce pigment résulte ainsi de la convergence de deux réactions. C'est peut être la raison pour laquelle la radioactivité s'accumule souvent dans cette xanthophylle, tant à partir du $^{14}CO_2$ que de ^3H_2O. Cette réaction (6) explique également qu'à la lumière, la teneur en violaxanthine diminue dans les feuilles, alors que l'époxylutéine s'accumule (fig. 31)

La réaction (7) avait été mise en évidence avec d'autres techniques par Sapozhnikov et *al.* (1957) et par Blass, D. G. Anderson et Calvin (1959). Nous avons vu que cette réaction est lente dans les suspensions de chloroplastes. Il est possible

que dans la réduction de la violaxanthine en lutéine, l'époxylutéine soit un intermédiaire et que la réaction (5) soit réversible :

$$\text{époxylutéine} \underset{\text{(O)}}{\overset{\text{(O)}}{\rightleftharpoons}} \text{lutéine}$$

Nous n'avons pas pu synthétiser une quantité suffisante d'époxylutéine marquée pour vérifier cette hypothèse formulée par ailleurs par YAMAMOTO, NAKAYAMA et CHICHESTER (1962 *a*).

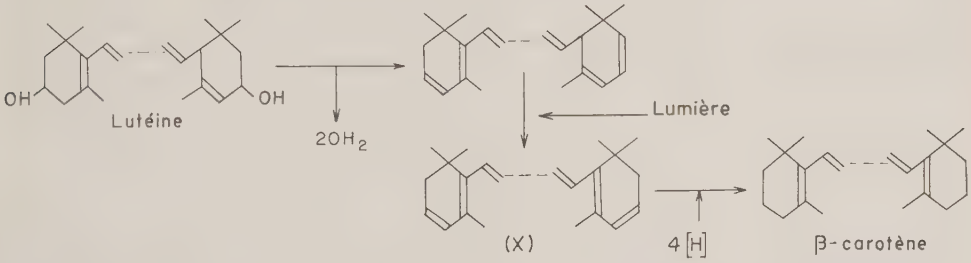
— *Les réactions de réduction des xanthophylles en β-carotène nous semblent les plus originales.*

MOSTER et QUACKENBUSH (1952 *b*) avaient déjà explicitement formulé l'hypothèse d'une formation de β-carotène à partir de la zéaxanthine dans les feuilles. De même SAAKOV (1963) a montré en même temps que nous qu'une partie de la radioactivité de la violaxanthine ^{14}C se retrouve dans les carotènes de chloroplastes. Mais nous avons rassemblé un certain nombre de faits expérimentaux convergents qui nous permettent d'écrire les réactions suivantes :

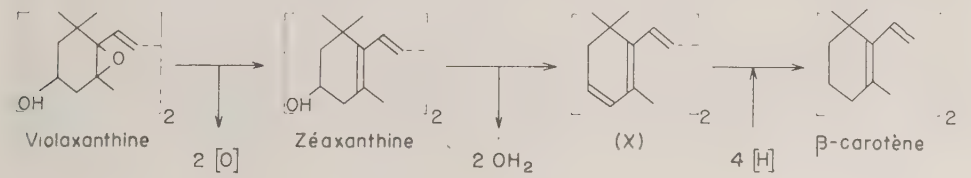
$$\text{zéaxanthine} + 4\,(H) \longrightarrow \beta\text{ carotène} + 2\,H_2O \qquad (8)$$
$$\text{lutéine} + 4\,(H) \longrightarrow \beta\text{ carotène} + 2\,H_2O \qquad (9)$$
$$\text{violaxanthine} + 4\,(H) \longrightarrow \beta\text{ carotène} + 2\,H_2O + 2\,(O) \qquad (10)$$

Le mécanisme de ces réductions est hypothétique. Rappelons simplement que la lumière semble indispensable à la transformation de lutéine en β-carotène. A titre d'hypothèse nous proposons le schéma suivant du mécanisme de ces réactions. Dans la série β comme dans la série α, la transformation d'une xanthophylle se ferait par une déshydratation suivie d'une réduction, mais :

— à partir de la lutéine, la lumière permettrait l'isomérisation du cycle α en cycle β avant la réduction, en accélérant la conjugaison des deux systèmes de doubles liaisons :



— à partir de la violaxanthine, ou de la zéaxanthine, il n'y a pas isomérisation et la réduction se fait aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité.



Ce type de réaction (déshydratation suivie d'une réduction) est très fréquent dans le métabolisme et il a été observé jusque dans la série des stéroïdes (Talalay, 1957). L'intermédiaire X dont nous postulons l'existence n'est pas hypothétique : c'est le 3,4-3',4'-*bis*-déhydro-β-carotène dont Winterstein (1960) a déjà soupçonné le rôle dans la biosynthèse de la vitamine A_2. Bodea et *al.* (1959) l'ont isolé dans le mélange réactionnel d'oxydation du β-carotène par des peroxydes, *in vitro*. Les indices électroniques de ce corps, rapportés par B. Pullman et A. Pullman (1963), montrent qu'il est très réactif (fig. 46). En effet, comme l'expriment ces auteurs, il apparaît que :

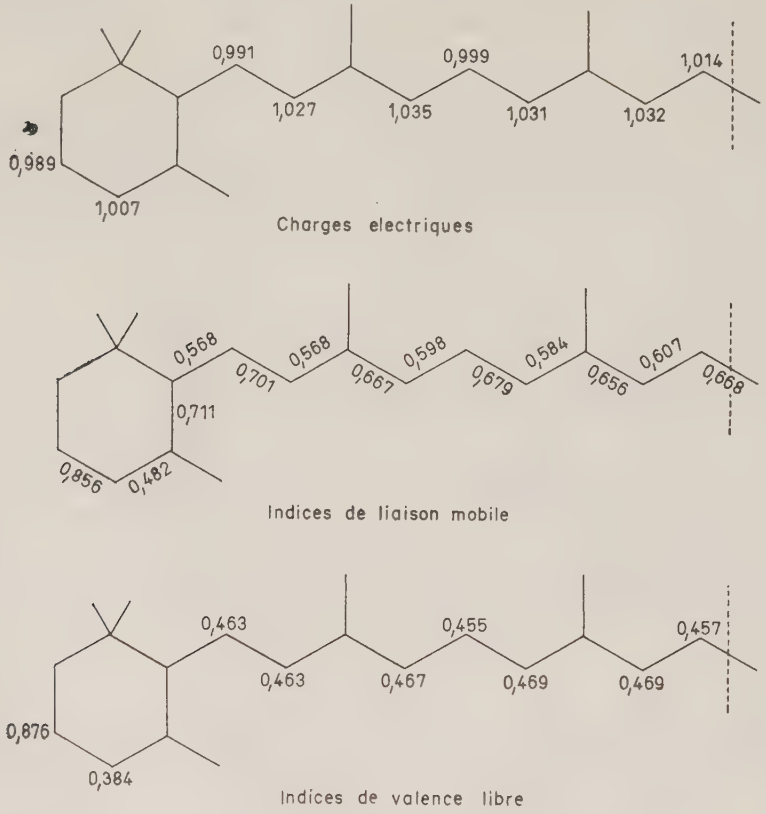


Fig. 46. — *Indices électroniques du* bis-*déhydro*-3,4-3',4'-*β-carotène.* (D'après Pullman et Pullman (1963))

— le *bis*-déhydro-β-carotène, qui est un excellent accepteur d'électrons, doit pouvoir être transformé, *in vivo*, en β-carotène, par hydrogénation ;

— ce corps peut être particulièrement susceptible de réactions d'addition sur les liaisons 3, 4 et 3', 4' qui ont l'indice de liaison mobile le plus élevé et dont le carbone-3 a le plus fort indice de valence libre de la molécule.

Ses propriétés chimiques, prévues théoriquement, étayent singulièrement notre hypothèse sur le mécanisme de réduction des xanthophylles en β-carotène. La forte réactivité du *bis*-déhydro-β-carotène peut même expliquer qu'il soit très rapidement métabolisé, ne s'accumule pas et n'ait pas été signalé *in vivo* jusqu'à maintenant,

Notre hypothèse sera nettement valorisée si l'on réussit à provoquer l'accumulation de ce corps dans les feuilles, de façon à pouvoir l'extraire et l'identifier : c'est à ce travail que nous pensons nous consacrer maintenant, ainsi qu'à la recherche de la répartition de ^3H entre les différents atomes de carbone du β-carotène, à partir de ^3H_2O.

Cependant, même si nous n'en connaissons pas le mécanisme, la réduction des xanthophylles en β-carotène paraît bien établie par nos résultats expérimentaux. Il en résulte que le β-carotène est au carrefour de plusieurs chaînes métaboliques : par la réaction (1) il dérive directement d'un précurseur acyclique en C_{40} et par les réactions (8), (9) et (10) il provient des xanthophylles. *Le β-carotène peut être synthétisé* in vivo *suivant au moins 4 voies métaboliques convergentes.* Ce fait suffit à expliquer qu'à partir d'un métabolite marqué donné à des feuilles, le β-carotène ait une radioactivité spécifique (R.S.) élevée : il peut en effet avoir simultanément non seulement un, mais plusieurs précurseurs immédiats fortement radioactifs, par exemple le phytofluène et la zéaxanthine. De plus, nous pensons que la facilité avec laquelle la zéaxanthine, de structure β, peut être réduite en β-carotène (ou oxydée en violaxanthine), permet de comprendre que cette xanthophylle ne s'accumule pas dans les feuilles dans les conditions normales.

Cette conception d'une pluralité des voies de biosynthèse du β-carotène s'impose d'ailleurs à partir d'observations sur la répartition des caroténoïdes dans les fruits de la Tomate en fonction de la température de maturation (Tomes, 1963). Constatant que si la maturation se fait à plus de 32°C, seule la synthèse du β-carotène n'est pas réduite alors qu'elle l'est pour tous les polyènes acycliques, Tomes en arrive à conclure : « *there are two kinds of β-carotene in the tomato. These cannot be separated chemically and there is no reason to believe that they represent different entities. One kind is not synthetized at 32°C ; the other type is produced at these temperatures. One kind is not synthetized from lycopene ; the other type may be synthetized from lycopene or its immediate precursors.* »

Nous avons vu par ailleurs que le β-carotène est le pigment le plus rapidement dégradé à la lumière. Nous venons de montrer qu'il a le plus grand nombre de voies métaboliques de biosynthèse parmi les caroténoïdes des feuilles. Comme il ne s'accumule pas et que sa teneur varie peu dans les feuilles vertes au cours de la journée, nous devons bien admettre que le β-carotène a une vitesse de renouvellement supérieure à celle de tous les autres pigments foliaires : mais maintenant nous connaissons les composantes de ce renouvellement.

D. Conclusion générale et Perspectives

Ce travail, tout en donnant la solution de certaines questions, nous a permis de nous rendre compte à la fois de la simplicité formelle et de la complexité du métabolisme des pigments dans les chloroplastes.

Ce métabolisme nous paraît complexe car la signification de certains faits nous échappe encore. Par exemple, *il est difficile de situer la néoxanthine par rapport aux autres xanthophylles dans une chaîne métabolique.* Tout au plus peut-on penser qu'elle dérive de la zéaxanthine ou de la violaxanthine. Des données récentes (Krinsky et Gordon, 1963) montrent que l'apparition de la néoxanthine est étroitement liée

à l'apparition de l'activité photosynthétique dans les cellules en voie de verdissement. Mais tant qu'on ne connaît pas sa structure avec certitude, toute hypothèse sur le rôle de la néoxanthine est prématurée. De même, *nous ne comprenons pas clairement l'absence quasi générale d'α-carotène dans les feuilles vertes.* Nous avons montré que ce pigment est rapidement oxydé en lutéine et il est possible que la réduction de la lutéine en α-carotène soit une réaction impossible ou très lente à la lumière. Si cette hypothèse est exacte, nous comprenons alors que l'α-carotène apparaisse de préférence dans un organe végétal vivant à l'obscurité, comme la racine de carotte,

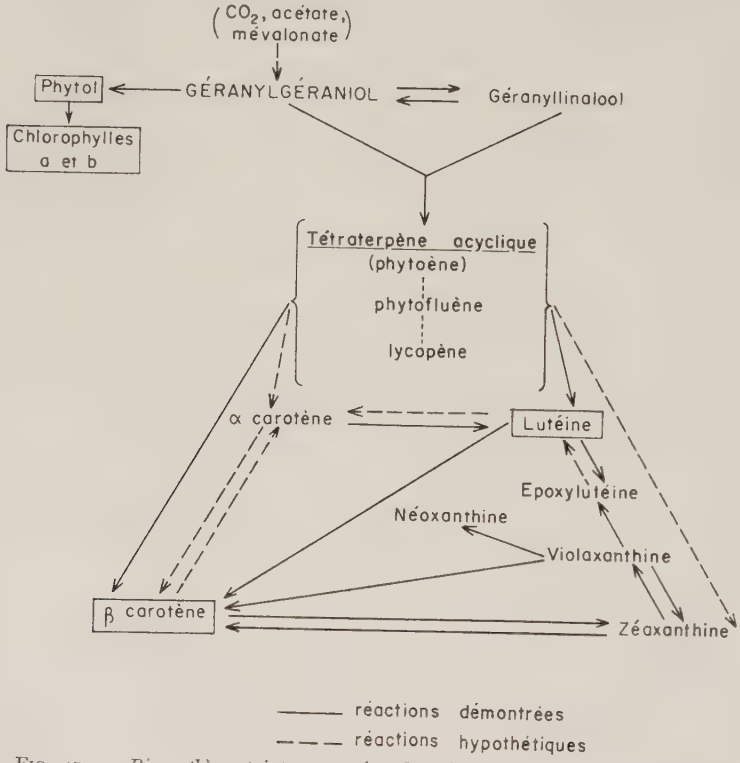


FIG. 47. — *Biosynthèse et interconversion des pigments dans les chloroplastes*

et qu'il soit peu abondant dans les organes vivant à la lumière comme les feuilles, où c'est la forme oxydée de structure α, la lutéine, qui est la plus stable.

Mais par bien des côtés le métabolisme pigmentaire est simple car il présente une certaine unité. Nous ne prétendons pas, comme nous venons de le dire, expliquer toutes les relations entre les caroténoïdes : cependant nous avons réuni dans la figure 47 tout ce qui ressort de nos résultats expérimentaux. Les conclusions que l'on peut tirer de ces résultats nous semblent intéressantes à la fois sur le plan de la biochimie et sur celui de la physiologie des cellules chlorophylliennes.

Du point de vue de la biochimie, trois faits saillants apparaissent :

1. *A un niveau assez élaboré de la biosynthèse* (C_{20}), *il existe un lien organique commun aux voies métaboliques qui conduisent aux caroténoïdes et au phytol :* ce lien est le géranylgéraniol. MARTIUS (1961) a montré par ailleurs que ce corps peut être

précurseur de la chaîne polyisoprénique des ubiquinones. La biosynthèse des molécules de substances liposolubles ayant une partie isoprénique se trouve sous la dépendance de la biosynthèse du géranylgéraniol. C'est peut-être sur cet alcool que s'exerce la régulation des rapports quantitatifs entre les différentes classes de pigments et les quinones, rapports dont on a remarqué la constance dans les chloroplastes.

2. *L'hydroxylation conduisant aux xanthophylles est indépendante de la cyclisation des tétraterpènes acycliques.* Il semble que la cyclisation se produise parallèlement sur les hydrocarbures polyéniques et sur les dialcools en 3 et 3′ qui leur correspondent. Il serait intéressant de rechercher dans les feuilles, l'existence de ces alcools dérivés du phytoène, du phytofluène, du ζ-carotène, du neurosporène ou du phytofluène. Nous savons que le phytofluénol a déjà été isolé (Zeichmeister et Pinckard, 1948).

3. *Les interconversions entre les caroténoïdes résultent de réactions d'oxydation mais également de réactions de réduction.*

Ce sont principalement les réactions d'oxydation des caroténoïdes qui avaient été envisagées jusqu'au présent travail. Au terme d'une série d'expériences conduites sur des mutants de *Chlorella*, Claes (1959) avait suggéré une transformation oxydative des carotènes en xanthophylles. Nous avons confirmé ce résultat par la méthode des traceurs radioactifs. Mais le propre d'un mutant est de faire apparaître certaines réactions en ne réalisant pas les autres. La réduction des xanthophylles en β-carotène, que nous avons observée, n'est pas en contradiction avec les résultats de Claes, elle les complète. D'une part *la synthèse du β-carotène est indépendante de celle des xanthophylles, d'autre part, une fois synthétisés, un carotène ou une xanthophylle peuvent se transformer l'un en l'autre.*

Cette conception permet d'expliquer deux séries de faits.

En premier lieu, nous savons que les feuilles de plantes étiolées à l'obscurité, contiennent principalement des xanthophylles et peu de β-carotène (Kay et Phinney, 1956*a*, Goodwin et Phagpolngarm, 1960) : c'est seulement à la lumière que s'accélère la synthèse du β-carotène dans les feuilles étiolées. Dans ces conditions, il est difficile de penser que les xanthophylles dérivent du β-carotène puisqu'elles semblent se former avant le β-carotène. Cela s'interprète très bien au contraire si l'on admet que les deux voies de biosynthèse sont séparées.

En second lieu, il est bien connu qu'à l'automne, les feuilles des arbres jaunissent : Goodwin (1958 *a*) a montré que simultanément les xanthophylles sont estérifiées et le β-carotène disparaît. Grob et Eichenberger (1962) ont confirmé ce point en précisant que la synthèse des caroténoïdes cesse à ce moment et que l'estérification des xanthophylles « d'été » est une conséquence de l'altération des chloroplastes. Or une estérification du groupe —OH en C_3 des xanthophylles empêche la réduction de ces xanthophylles en β-carotène et ainsi supprime la dernière voie de biosynthèse de ce pigment. Comme par ailleurs la biosynthèse des tétraterpènes a cessé, nous voyons qu'il est normal d'observer l'estérification des xanthophylles en même temps que la disparition du β-carotène : nous pouvons établir une relation de cause à effet entre le premier et le second de ces phénomènes puisque nous avons démontré d'une part la réalité des réactions de réduction des xanthophylles, d'autre part la destruction très rapide du β-carotène à la lumière.

Sur le plan de la physiologie cellulaire, les points que nous venons de dégager laissent entrevoir d'intéressantes perspectives.

Comme nous l'avons signalé dans notre introduction, de nombreux chercheurs ont pensé à un rôle des caroténoïdes dans le dégagement d'oxygène à la lumière chez les végétaux chlorophylliens (Dorough et Calvin, 1951 ; Warburg et Krippahl, 1955 ; Cholnoky et *al.*, 1956 ; Warburg et *al.*, 1958 ; Sapozhnikov et *al.*, 1961). Le fait que les xanthophylles puissent échanger des atomes d'oxygène semble étayer cette hypothèse. Mais nous avons vu que les expériences avec $H_2{}^{18}O$ n'ont pas permis de montrer une circulation rapide de l'oxygène dans les molécules de xanthophylles (Shneour et Calvin, 1962) : cela fait douter d'une participation *active* des caroténoïdes à cette étape de la photosynthèse.

Cependant, l'association des caroténoïdes aux étapes photochimiques primaires de la photosynthèse ne fait guère de doute : mais, comme nous allons le voir, cette association présente des aspects variés et paraît souvent indirecte.

D'abord, il convient de noter que *les caroténoïdes se conduisent comme des photorécepteurs qui transmettent à la chlorophylle* a *l'énergie qu'ils ont absorbée.* Ainsi chez *Nitzschia closterium*, Dutton et *al.* (1943) ont montré que la fluorescence de la chlorophylle *a* est aussi intense si la lumière excitatrice est celle qui est entièrement absorbée par la chlorophylle *a* que s'il s'agit de lumière bleu-vert fortement absorbée par la fucoxanthine, le principal caroténoïde de cette diatomée, Par la suite, Dutton et Manning (1947) observent que la photosynthèse se produit avec le même rendement chez *Nitzschia closterium*, que la lumière soit absorbée par la chlorophylle *a* ou par la fucoxanthine. Enfin, les travaux de Duysens (1952 et 1956) ont bien mis en évidence le transfert d'énergie des molécules de caroténoïdes aux molécules de chlorophylle *a* : 40 à 50 p. 100 de l'énergie absorbée par les caroténoïdes est transmise à la chlorophylle *a* chez *Chlorella*. Plus récemment, ce transfert d'énergie a été observé chez les Bactéries pourpres (Goedheer, 1959) et, chez *Chromatium*, les caroténoïdes transmettent à la bactériochlorophylle l'énergie qu'ils ont absorbée, permettant ainsi indirectement la phosphorylation photosynthétique (Fuller et *al.*, 1961). Ce rôle photosensibilisateur des caroténoïdes semble donc solidement établi. Il n'implique pas une transformation de longue durée des molécules de pigment et ce fait s'accorde bien avec ce que l'on sait de la rigidité de situation des caroténoïdes dans les chloroplastes : en effet, les spectres de diffusion de la lumière par les suspensions de *Chlorella* montrent une diffusion sélective produite par les caroténoïdes, ce qui laisse supposer que les molécules de ces pigments sont fortement agglomérées et ordonnées dans les structures chloroplastiques (Latimer et Rabinowitch, 1956 et 1959).

Par ailleurs, nous savons que *les caroténoïdes protègent les structures des chloroplastes contre la destruction photooxydative induite par la lumière absorbée par les molécules de chlorophylle.* Dès 1954, Claes a décrit un mutant de *Chlorella*, sans caroténoïdes cycliques, qui ne peut croître qu'à l'obscurité : les cellules sont tuées par exposition à la lumière en aérobiose. Griffith et *al.* (1955) isolent un mutant « bleu-vert » de *Rhodopseudomonas spheroides*, dont les chromatophores ne contiennent pas de caroténoïdes autre que le phytoène : dans une culture des cellules de ce mutant exposées à la lumière et à l'air, la croissance s'arrête brusquement et la chlorophylle commence à disparaître. Il y a destruction massive des cellules et il faut remarquer que ni la lumière, ni l'air n'ont d'action séparément : cette destruction résulte bien d'une action photodynamique telle qu'elle a été définie par Blum (1941). Enfin, I. C. Anderson et Robertson (1960) ont observé pour la première fois le même

phénomène chez un mutant de plante supérieure : dans les feuilles de mutant *white 3* du Maïs, il y a blocage métabolique de la synthèse des caroténoïdes au niveau du phytoène. La formation de la chlorophylle et des chloroplastes paraît normale chez ce mutant, mais la chlorophylle est détruite *en aérobiose*, seulement sous l'action de fortes intensités lumineuses.

Bien établi, ce rôle protecteur des caroténoïdes contre la photooxydation est difficile à expliquer. D'une part, les propriétés antioxygène de ces pigments sont connues depuis longtemps : certaines oxydases n'agissent pas sur leur substrat en présence de β-carotène (Hérisset, 1948). De même, nous avons montré que la lutéine et la zéaxanthine peuvent s'époxyder très facilement et que les carotènes peuvent s'oxyder en xanthophylles : il est possible, que par ces réactions, les caroténoïdes évitent l'accumulation d'oxygène actif au niveau des chloroplastes. Par ailleurs, l'action protectrice contre l'action de la lumière peut s'interpréter par l'effet écran des caroténoïdes : ces pigments absorberaient la lumière préférentiellement aux chlorophylles. C'est ainsi que Claes et Nakayama (1959) ont comparé l'efficacité de plusieurs tétraterpènes acycliques (phytoène, phytofluène, ζ-carotène, neurosporène et lycopène) et du β-carotène dans la protection contre la destruction de la chlorophylle *a* à la lumière, en solution dans l'éther de pétrole : l'effet protecteur n'apparaît que pour les polyènes ayant au moins 9 doubles liaisons conjuguées, c'est-à-dire pour le neurosporène, le lycopène et le β-carotène. Ces pigments absorbent en effet la lumière dans la partie du spectre correspondant à la bande d'absorption « bleue » de la chlorophylle *a* et il est possible que cette absorption entre en compétition avec l'absorption d'énergie par les molécules de chlorophylle. Plus récemment, Krasnovsky et Drosdova (1961), ont observé, *in vitro*, une inhibition de la photoréduction de la chlorophylle *a* par l'acide ascorbique *sous la lumière rouge*, en présence de β-carotène, de lutéine ou de violaxanthine. Plus le caroténoïde renferme de doubles liaisons conjuguées, plus l'inhibition est forte. Il n'a jamais été possible d'isoler du mélange réactionnel (ou de déceler) un produit réduit stable provenant de la photoréduction sensibilisée des caroténoïdes. Dans ces expériences l'effet inhibiteur sur la photoréduction de la chlorophylle *a* serait dû à un captage réversible d'électrons par le système de double liaison conjuguée des caroténoïdes, mais le mécanisme de ce phénomène est encore peu clair (Krasnovsky, 1964). Il est possible qu'un mécanisme analogue intervienne dans la protection des chlorophylles, mais la difficulté consiste à expliquer l'effet protecteur contre l'action simultanée de la lumière et de l'oxygène.

Dès 1955, Calvin rappelle le mécanisme en jeu dans la photooxydation d'un substrat quand la photooxydation est sensibilisée par la chlorophylle. Il y aurait à la lumière une transition du premier état singlet excité de la molécule de chlorophylle en un état triplet de longue vie (plus de 10^{-3} seconde). La molécule à cet état triplet pourrait se combiner avec une molécule d'oxygène pour former un peroxyde très réactif qui peut ensuite transmettre son oxygène à un réducteur approprié, laissant revenir le sensibilisateur à l'état fondamental. Pour expliquer l'effet protecteur, Calvin propose alors de considérer les caroténoïdes comme les accepteurs préférentiels de l'oxygène venant du peroxyde. En fait, nous avons vu que les carotènes β et α s'oxydent pour donner des xanthophylles. Mais Calvin (1955) ajoute : « *This would require a reductive process for the regeneration of carotenoid* » et *il est possible de considérer la réduction des xanthophylles en β-carotène, que nous*

avons mise en évidence, comme un type de cette réaction de régénération du β-carotène. Une telle suite de réactions transformant les caroténoïdes doit se traduire par des variations rapides des maximums d'absorption de ces pigments *in vivo*. En effet, les résultats obtenus par spectrophotométrie différentielle sur des suspensions de *Chlorella*, de *Chlamydomonas*, ou de *Rhodopseudomonas spheroides* permettent de soupçonner une forte réactivité de ces pigments dans les chloroplastes à la lumière : dans ces cellules l'éclairement provoque une diminution de l'absorption de lumière dans la gamme de longueur d'onde 475-500 mμ, qui correspond aux maximums d'absorption des caroténoïdes *in vivo* (Chance et Strehler, 1957 ; Smith et Ramirez, 1959 et 1960 ; Nishimura et Chance, 1963 ; Lundegardh, 1963 et 1964). Cette variation dans l'absorption semble bien attribuable aux caroténoïdes, car elle est distincte de celle qui est due à l'oxydation des cytochromes et elle ne se produit pas chez des mutants privés de caroténoïdes (Chance et Strehler, 1957).

Enfin, le rôle protecteur des caroténoïdes à l'égard des chloroplastes ne se réduit peut-être pas à une protection contre l'action photosensibilisatrice de la chlorophylle. *A titre d'hypothèse, nous proposons de chercher la nature de ce mécanisme protecteur dans la vitesse de renouvellement élevée du β-carotène.* En effet, les travaux d'Arnon (1959) ont montré que l'originalité de la photosynthèse réside en la formation dans les chloroplastes d'ATP et d'un réducteur, à la lumière. Si la lumière devient trop intense, comme cela arrive souvent dans les conditions naturelles, le photoréducteur peut s'accumuler en un temps très court. Il est possible que l'excès de $NADPH_2$ ainsi produit et non immédiatement utilisé à la réduction de l'acide 1,3-diphosphoglycérique soit orienté vers la réduction des xanthophylles. Il se formerait alors du β-carotène en excès qui, très photosensible, serait rapidement détruit par la lumière intense.

Cette dernière hypothèse décrit un mécanisme régulateur au niveau cellulaire, ayant pour résultat la protection des chloroplastes contre les brusques variations d'intensité lumineuse, et impliquant les caroténoïdes. Il s'agit d'une vue purement spéculative qui reste à démontrer expérimentalement, mais qui illustre comment la connaissance des possibilités réactionnelles d'un groupe de corps peut être précieuse pour essayer d'expliquer les phénomènes physiologiques.

RÉSUMÉ

A l'origine de ce travail il y a deux observations. La première est l'existence de liens statiques et dynamiques entre les caroténoïdes et les chlorophylles dans les feuilles. La seconde concerne le caractère particulier du β carotène qui en fait le pigment chloroplastique dont la vitesse de renouvellement est la plus grande. Après avoir bien confirmé ce dernier fait, nous avons mis en évidence les points suivants :

1. La chaîne de biosynthèse du β-carotène, des xanthophylles et du phytol de la chlorophylle est commune jusqu'au géranylgéraniol. Les métabolites précurseurs en C_{20} des caroténoïdes sont le géranyllinalool et le géranylgéraniol qui interviennent après l'acétate et le mévalonate. Les précurseurs de biosynthèse étant communs à tous les pigments chloroplastiques, ce n'est donc pas dans cette première phase de la synthèse que réside la cause de la différence entre la vitesse de renouvellement du β-carotène et celle des autres pigments.

2. Après le géranylgéraniol, les caroténoïdes acycliques (phytofluène, lycopène) se transforment aussi bien en xanthophylles qu'en β-carotène. Donc les xanthophylles ne dérivent pas obligatoirement de l'oxydation des carotènes cycliques. La séparation entre la voie de biosynthèse du β-carotène

et celle de la lutéine se fait au niveau d'un tétraterpène acyclique, dont une partie conduit aux xanthophylles par hydroxylation, et l'autre partie subit une cyclisation qui donne directement le β-carotène.

3. Les carotènes peuvent s'oxyder en xanthophylles. Mais par un mécanisme réactionnel que nous ne connaissons pas encore de manière précise, les principales xanthophylles (lutéine, violaxanthine, zéaxanthine) peuvent se transformer enzymatiquement en β-carotène. Cette transformation implique une réduction dans la phase finale de la synthèse du β-carotène, réduction mise en évidence à partir de ^3H_2O.

Puisque le β-carotène est le pigment qui se dégrade le plus facilement, le fait qu'il puisse être synthétisé par plusieurs mécanismes convergents (à partir d'un tétraterpène acyclique et à partir des xanthophylles) explique une vitesse de renouvellement exceptionnellement élevée pour un pigment.

Ce renouvellement mettant en jeu des réactions de réduction, donc consommatrices d'énergie, le problème de la signification physiologique de cette consommation dans le bilan énergétique des feuilles est posé.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allen M. B., Goodwin T. W. et Phagpolngarm S., 1960. Carotenoid distribution in certain naturally occuring algae and in some artificially induced mutants of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Gen. Microbiol.*, **23**, 93-103.

Anderson I. C. et Robertson D. S., 1960. Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. *Plant Physiol.*, **35**, 531-534.

Anderson D. G., Norgard D. W. et Porter J. W., 1960. The incorporation of mevalonic acid 2-^{14}C and dimethylacrylic acid 3-^{14}C into carotenes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 68-77.

Anderson D. G. et Porter J. W., 1962. The biosynthesis of phytoene and other carotenes by enzymes of isolated higher plant plastids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 509-519.

Angapidu A., Silberman H., Tantivatana P. et Kaplan I. R., 1958. The separation of chlorophylls by paper and cellulose column chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 56-68.

Arnon D. I., Allen M. B. et Whatley F. R., 1956. Photosynthesis by isolated chloroplasts. IV. General concept and comparison of three photochemical reactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 449-461.

Arnon D. I., 1959. Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. *Nature*, **184**, 10-21.

Bandurski R. S., 1949. Synthesis of carotenoid pigments in detached bean leaves. *Bot. Gaz.*, **41**, 95-109.

Beck W. A. et Redman R., 1940. Seasonal variations in the production of plant pigments. *Plant Physiol.*, **15**, 81.

Beekman H., 1953. Über den Umsatz von Carotinoïden in Höheren Pflanzen. *Die Naturwissenschaften*, **40**, 486-487.

Beekman H., 1954. Untersuchungen über den Umsatz von Carotinoïden in Höheren Pflanzen. *Zeitschrift für Botanik*, **42**, 387-435.

Beeler D. A. et Porter J. W., 1962. The enzymatic conversion of phytoene to phytofluene. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **8**, 367-371.

Beeler D. A., Anderson D. G. et Porter J. W., 1963 The biosynthesis of squalene from mevalonic acid 2-^{14}C and farnesyl pyrophosphate 4-8-12-^{13}C by carrot and tomato enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **102**, 26-32.

Beeler D. A. et Porter J. W., 1963. Specific radioactivities of carotenes synthezised from ^{14}C labelled terpenol pyrophosphates by isolated tomato plastids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 167-170.

Bellamy L. J., 1960. *The infra-red spectra of complex molécules*. Methuen Ed., London.

Benedict C. R., Fuller R. C. et Bergeron J. A., 1961. (^{14}C) acetate incorporation into the carotenoids of *Chromatium*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **54**, 525-532.

Berzelius, 1837. Ueber de gelbe Farbe der Blätter im Herbste. *Annal Pharmacie, Dtsch*, **21**, 257-262.

Bickoff E. M., Livingston A. L., Bailey G. F. et Thompson C. R., 1954. Xanthophylls in fresh and dehydrated alfalfa. *J. Agric. Food Chem.*, **2**, 563-567.

Billot J. et Leroy Cl., 1960. Sur la genèse des pigments et l'activité photosynthétique des feuilles étiolées de *Phaseolus vulgaris* au cours du verdissement. *Rev. gén. de Bot.*, **67**, 477-521.

Blass U., Anderson J. M. et Calvin M., 1959. Biosynthesis and possible fonctionnal relationships among the carotenoids, and between chlorophyll *a* and chlorophyll *b*. *Plant Physiol.*, **34**, 329-333.

Blum H., 1941. *Photodynamic Action and Diseases caused by Light*. Reinhold éd., New York.

Bodea C., Nicoara E., Tamas V., 1959. Oxydation von β Carotin mittels Tetralinhydroperoxyds. *Liebigs Ann. Chem.*, **627**, 237-244.

Booth V. H., 1960. Inactivity of the carotene oxidizing system in Iris leaf. *J. Sci. Food Agric. G. B.*, **11**, 8-13.

BRAITHWAITE G. D. et GOODWIN T. W., 1957. Biosynthesis of β-carotene from DL-β-hydroxy-β methyl 5-(2-^{14}C) valerolactone by *Phycomyces blakesleanus* and carrot slices. *Biochem. J.*, **67**, 13-14.

BRAITHWAITE G. D. et GOODWIN T. W., 1960 *a*. Studies in carotenogenesis. XXVI. The incorporation of ^{14}C-acetate, ^{14}C-mevalonate and ^{14}C-O_2 into β carotene by the fungus *Phycomyces blakesleanus*. *Biochem. J.*, **76**, 5-10.

BRAITHWAITE G. D. et GOODWIN T. W., 1960 *b*. Studies in carotenogenesis. XXVII. Incorporation of 2-^{14}C-acetate DL-(2-^{14}C)-mevalonate and $^{14}CO_2$ into carrot root preparations. *Biochem. J.*, **76**, 194-197.

BRAITHWAITE G. D. et GOODWIN T. W., 1960 *c*. Studies in carotenogenesis. XXV. The incorporation of 1-^{14}C acetate, 2-^{14}C acetate and $^{14}CO_2$ into lycopene by tomato slices. *Biochem. J.*, **76**, 1-5.

BRUINSMA J., 1961. A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 576-578.

BRUINSMA J., 1963. The quantitative analysis of chlorophylls *a* and *b* in plant extracts. *Photochem. and Photobiol.*, **2**, 241-249.

CALVIN M., 1955. Dans réponse à l'article de GRIFFITHS M., SISTROM W. R., COHEN-BAZIRE G. et STANIER R. Y. Function of carotenoïd in Photosynthesis. *Nature*, **176**, 1211-1215.

CHANCE B. et STREHLER B., 1957. Effects of oxygen and red light upon the absorption of visible light in green plants. *Plant Physiol.*, **32**, 536-548.

CHICHESTER C. O., WONG P. S. et MAC KINNEY G., 1954. On the biosynthesis of carotenoids. *Plant Physiol.*, **29**, 238-241.

CHICHESTER C. O., NAKAYAMA T., MAC KINNEY G. et GOODWIN T. W., 1955. Incorporation of labeled leucine into carotene by *Phycomyces*. *J. Biol. Chem.*, **214**, 515-517.

CHOLNOKY L., GYÖRGYFY C., NORGY E. et POINCZEL H., 1956. Fonction des caroténoïdes dans les organes contenant de la chlorophylle. *Nature*, **178**, 410-411.

CHOLNOKY L. et SZABOLCS J., 1959. Untersuchungen über die Carotinoïdfarbstoffe. V. Über die Farbstoffe der Kelchblätter von *Physalis Alkekengi*. *Liebigs Ann. der Chemie*, **626**, 206-215.

CLAES H., 1954. Analyse der biochemischen Synthesekette für carotinoïde mit Hilfe von *Chlorella* Mutanden. *Z. Naturforschg.*, **9 B**, 461-470.

CLAES H., 1956. Biosynthese von Carotenoïden bei *Chlorella*. II. Tetrahyrdrolycopin und Lycopin. *Z. Naturforschg.*, **11 B**, 260-266.

CLAES H., 1957. Biosynthèse des caroténoïdes par les Chlorelles. III. Recherches sur la photosynthèse d'α- et de β-caroténes et de xanthophylles chez les mutants de *Chlorella* 5/520. *Z. Naturforschg.*, **12 B**, 401-407.

CLAES H., 1958. Biosynthese von Carotinoïden bei Chlorella. IV. Die Carotinsynthese einer *Chlorella* Mutante bei anaerober Belichtung. *Z. Naturforschg.*, **13 B**, 222-224.

CLAES H., 1959. Biosynthèse des caroténoïdes chez Chlorella. V. Séparation des réactions à la lumière et à l'obscurité dans la synthèse de la xanthophylle nécessitant la lumière chez *Chlorella*. *Z. Naturforschg., B*, **14**, 4-7.

CLAES H. et NAKAYAMA T. O. M., 1959. Das photoxydative Ausbleichen von Chlorophyll *in vitro* in Gegenwart von Carotinen mit verschiedenen chromophoren Gruppen. *Z. Naturforschg.*, **14 B**., 746-747.

COSTES C. et COÏC Y., 1957. Variations des pigments foliaires en fonction de la carence en azote et du vieillissement chez le Tabac. *C. R. Acad. Sci.*, **244**, 1398-1401.

COSTES C., 1958. Séparation et dosage des caroténoïdes foliaires par chromatographie sur cellulose. *Ann. agron.*, sup. **1 A**, 35-48.

COSTES C., 1962. Action d'alcools diterpéniques sur la biosynthèse des caroténoïdes et du phytol à partir d'acétate-2-^{14}C chez les plantules de Maïs. *C. R. Acad. Sci.*, **255**, 355-357.

COSTES C., 1963 *a*. Biosynthèse des caroténoïdes par les chloroplastes des feuilles de Maïs à partir de Phytofluène-^{14}C. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 3535-3537.

COSTES C., 1963 *b*. Incorporation de $^{14}CO_2$, d'acétate-2-^{14}C et de mévalonate-2-^{14}C dans les caroténoïdes de la feuille adulte de Tomate. *Ann. Physiol. vég.*, **5**, 115-140.

COSTES C., 1963 *c*. Métabolisme de la lutéine et de la violaxanthine dans les chloroplastes. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 5656-5659.

CRANE F. L., 1961. Isolation and characterisation of the coenzyme Q group and plastoquinone. Dans *Ciba Found Symp. on Quinones in Electron transport*. J. A. Churchill Ltd, Londres, 36-78.

CVÈTANOVIC R. J., 1958. Molecular rearrangements in the reactions of oxygen atoms with olefins. *Canad. J. Chem.*, **36**, 623-634.

DAVIES B. H., 1962. Biosynthesis of carotenoids. *Biochem. J.*, **85**, 2 P.

DAVIES B. H., JONES D. et GOODWIN T. W., 1963. Studies in carotenogenesis. B. The problem of lycopersen formation in *Neurospora crassa*. *Biochem. J.*, **87**, 326-329.

DECKER K. et UEHELEKE H., 1961. Ein enzymatische Isomerisierung von Lycopin und β-Carotin. Hoppe Seyler's *Physiol. Chem.*, **323**, 61-76.

DEMOLE E., 1958. Applications de la microchromatographie d'absorption sur couches minces. *J. Chromat.*, **1**, 24.

DEMOLE E. et LEDERER E., 1958. Isolement du phytol, de l'isophytol et du géranyllinalool à partir d'essence concrète de jasmin. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1128-1137.

Dorough G. D. et Calvin M., 1951. The path of oxygen in photosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2362-2365.

Duranton J., Galmiche J. M. et Roux E., 1958. Métabolisme des pigments chlorophylliens. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **246**, 992-995.

Duranton H. et Maille M., 1962. Métabolisme de la proline chez le Topinambour. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, 271-294.

Dutton H. J. et Juday C., 1944. Chromatic adaptation in relation to color and depth distribution of freshwater phytoplankton and large aquatic plants. *Ecology*, **25**, 273-282.

Dutton H. J. et Manning W. M., 1943. Evidence for a carotenoid-sensitized photosynthesis in the diatom *Nitzschia closterium*. *Ann. J. Bot.*, **28**, 516-526.

Dutton H. J., Manning W. M. et Duggar B. M., 1943. Chlorophyll fluorescence and energy transfer in the diatom *Nitzschia closterium*. *J. physic. Chem.*, **47**, 308-313.

Duysens L. N. M., 1952. *The transfer of excitation energy in photosynthesis*. Thesis. Utrecht.

Duysens L. N. M., 1956. Energy transformations in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **7**, 25-50.

Ehrenberg L. et Daniel A. F., 1962. On the role of leucine in carotenoids synthesis of the chloroplasts of higher plants. *Acta Chem. Scand.*, **16**, 1523-1526.

Eichenberger W. et Grob E. C., 1962 *a*. Beiträge Zur Biochemie der planzlichen Plastiden. I. Mitteilung Zur Kenntnis der Herbstfarbung. *Helv. Chim. Acta. XLV*. Fasc. III, 974-981.

Eichenberger W. et Grob E. C., 1962 *b*. Beiträge Zur Biochemie der pflanzlichen Plastiden. 2. Über die Herbstcarotinoïde von *Acer platanoides*. *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1556-1563.

Elliott W. B. et Kalnitski G., 1950. The oxidation of acetate. *J. Biol. Chem.*, **186**, 477-486.

Faludi B., Daniel A. F., et Kelemen G., 1960. Increased photosensivity of leaf pigments and its relation to the respiratory system in albino mutants of corn. *Physiol. Plant, Danem.*, **13**, 227-236.

Fisher F. G., Markel G., Honel H. et Rüdiger W., 1962. Bildung und Vorkommen von Phytol. III. Einbau von Essigsäure und Mevalonsaüre-2-^{14}C in chlorophyll, sterine und carotinoïde von Gerstenkeimlingen. *Liebigs Ann. der Chem.*, **657**, 199-212.

Frank S. et Kenney A., 1955. Chlorophyll and carotenoid destruction in the absence of light in seedlings of *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, **30**, 413-418.

Frémy M. E., 1860. Recherches sur la matière colorante verte des feuilles. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **50**, 405-412.

Friend J. et Mayer A. M., 1960. The enzymatic destruction of carotenoids by isolated chloroplats. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 422-429.

Fuller R. C., Bergeron J. A. et Anderson I. C., 1961. Relation of photosynthetic Activity to carotenoid-bacteriochlorophyll interaction in *Chromatium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 273-279.

Godnev T. N., Rotfarb R. M. et Shlyk A. A., 1960. On the possibility of chlorophyll *a* transition into chlorophyll *b* in the process of its biosynthesis. *Doklad. Akad. Nauk. SSSR.*, **130**, n° 3, 663-666.

Godnev T. N. et Rotfarb R. M., 1962. Lycopene as a probable predecessor of other carotenoids. *Dokl. Akad. Nauk., SSSR*, **147**, 962-963.

Goedheer J. C., 1959. Energy transfer between carotenoids and bacteriochlorophyll in chromatophores of purple bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, 1-8.

Goldsmith T. H. et Krinsky N. I., 1960. The epoxide nature of the carotenoid neoxanthine. *Nature*, **188**, 491-493.

Goodman D. S. et Popjak G., 1960. Studies on the biosynthesis of cholesterol : XII. Synthesis of allyl pyrophosphates from mevalonate and their conversion into squalene with liver enzymes. *J. Lipid Research*, **1**, 286-300.

Goodwin T. W. et Lijinky W., 1952. Studies in carotenogenesis. Carotene production by *Phycomyces blakesleanus* : the effect of different aminoacids when used in media containing low concentration of glucose. *Biochem. J.*, **50**, 268-273.

Goodwin T. W., 1952. *The comparative biochemistry of the carotenoids*. Chapman and Hall Ltd, London.

Goodwin T. W., 1955. In : Peach K. et Tracey M. W. *Modern methods of plant analysis — Carotenoids*. III, 272-311 Springer Verlag, Berlin.

Goodwin T. W., 1958 *a*. Studies in carotenogenesis. XXIV. The changes in carotenoid and chlorophyll pigments in the leaves of deciduous trees during autumn necrosis. *Biochem. J.*, **68**, 503-511.

Goodwin T. W., 1958 *b*. Comparison of the incorporation of labelled CO_2, acetate and mevalonate into carotenoids in a number of carotenogenic systems. Ciba Found Symp. Biosynth. Terpenes and Sterols, 279-291.

Goodwin T. W., 1958 *c*. Studies in carotenogenesis. XXV. The incorporation of $^{14}CO_2$, (2-^{14}C) acetate and (2-^{14}C) mevalonate into β-carotene by illuminated etiolated maize seedlings. *Biochem. J.*, **70**, 612-617.

Goodwin T. W. et Phagpolngarm S., 1960. Studies in carotenogenesis. XXVIII. The effect of illumination on carotenoïd synthesis in french bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. *Biochem. J.*, **76**, 197-199.

Goodwin T. W., 1960. The biosynthesis of vitamin A-active carotenoids. Fourth Intern. *Congress of Biochem.*, **11**, 54-72 (Pergamon Press).

Goodwin T. W., 1963. *Regulation of terpenoid biosynthesis in higher plants*. Conference, Gif-sur-Yvette (18 novembre 1963).

GRANICK S., 1961. « The cell » par J. BRACHET et A. E. MIRSKY. *The chloroplasts : Inheritance, Structure and Function.* II, 489-595.

GRIFFITHS M., SISTROM W. R., COHEN-BAZIRE G. et STANIER R. Y., 1955. Function of carotenoids in Photosynthesis. *Nature,* **176,** 1211-1215.

GROB E. C., PORETTI G. G., MURALT A. V. et SCHOPFER W. H., 1951. Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un microorganisme. *Experientia,* **6,** 218.

GROB E. C., 1957. L'acide mévalonique comme stade précurseur dans la biosynthèse des caroténoïdes par *Mucor hiemalis. Chimia,* **11,** 338-339.

GROB E. C., KIRSHNER K. et LYNEN F., 1961 *a.* Neues über die Biosynthese der Carotinoïde. *Chimia,* **15,** 308-309.

GROB E. C., EICHENBERGER W., et PFLUGSHAUPT R. P., 1961 *b.* Zur Bildung der Carotinoïde in Blattern, Blüten und Früchten. *Chimia,* **15,** 565-566.

GROB E. C. et EICHENBERGER W., 1962. Some aspects of the biogenesis of carotenoids in autumn leaves. *Biochem. J.,* **85,** 11 P.

HAGER A., 1957 *a.* Über den Einflus Klimatischer Faktoren auf den Blattfarbstoffgehalt hoherer Pflanzen. *Planta,* **49,** 524-560.

HAGER A., 1957 *b.* Zur chromatographie der Lipoidloslichen Blattfarbstoffe. *Planta,* **48,** 592-621.

HARASHIMA K., 1960. Biosynthesis of carotene in disks of carrot root. *Bull. Agr. Chem. Soc. of Japan,* **24,** 203-210.

HÉRISSET 1948. Nouvelles recherches sur les propriétés antioxygènes de quelques caroténoïdes. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* **30,** 187-195.

HEY D., 1937. Eloxanthin : a new carotenoid pigment from the pondweed *Elodea canadensis. Biochem. J.,* **31,** 532-534.

IWATA I., NAKATA H. et SAKURAI Y., 1961. Lipids of algae. II. Carotenoid pigments of *Chlorella. Agric. Biol. Chem.,* **25,** 377-382.

JEFFREY R. N. et GRIFFITH R. B., 1947. Changes in the chlorophyll and carotene contents of curing burley tobacco cut at different stages of matury. *Plant Physiol.,* **22,** 34-41.

JENSEN S. L., 1961. Bacterial Carotenoids. VIII. A structural scheme for the biosynthesis of coloured carotenoids in the photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum. Acta Chem. Scand.,* **15,** 1182-1184.

JENSEN S. L., COHEN-BAZIRE G., NAKAYAMA T. O. M. et STANIER R. Y., 1958. The path of carotenoid synthesis in a photosynthetic bacterium. *Bioch. Biophys. Acta.,* **29,** 477.

JENSEN S. L., COHEN-BAZIRE G. et STANIER R. Y., 1961. Biosynthesis of carotenoids in purple bacteria ; a reevaluation based on considerations of chemical structure. *Nature,* **192,** 1168-1172.

JENSEN A. et JENSEN S. L., 1959. Quantitative paper chromatography of carotenoids. *Acta Chem. Scand.,* **13,** 1863-1868.

JOLCHINE G., 1962. Le métabolisme de l'acide acétique dans les feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* BERGER. La genèse des acides organiques par différentes réactions de condensation du radical acétyle, dans les chloroplastes et dans la fraction cellulaire non chloroplastique. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* **44,** 337-364.

KARRER P. et RUTSCHMANN J., 1945. Über die Carotenoide aus *Elodea canadensis. Helv. Chim. Acta* **28,** 1526-1527.

KARRER P. et JUCKER E., 1950. *Carotenoids.* Elsevier Publishing Company, Inc.

KAY R. E. et PHINNEY B., 1956 *a.* Plastid pigment changes in the early seedling leaves of *Zea mays* L. *Plant Physiol.,* **31,** 226-231.

KAY R. E. et PHINNEY B., 1956 *b.* The control of plastid pigment formation by a virescent gene, pale-yellow I of maize. *Plant Physiology,* **31,** 415-420.

KRASNOVSKY A. A., 1964. *Communication personnelle.*

KRASNOVSKY A. A. et DROSDOVA N. N., 1961. A study of chlorophyll photoreduction in the presence of electron acceptors. *Biokhymia,* **26,** 859-871.

KRINSKY N. I. et GORDON A., 1963. Simultaneous appearance of neoxanthin and photosynthetic competence during the greening of dark-bleached *Euglena gracilis. Fed. Proceed.,* **22,** 587.

KRZEMINSKY L. F. et QUACKENBUSH F. W., 1960. Incorporation of ^{14}C labelled compounds into carotenes by *Neurospora crassa. Arch. Biochem. Biophys.,* **83,** 287-293.

KUHN R. et GRUNDMANN C., 1932. Die Konstitution des Lycopins. *Ber. Dtsch. Chem. Gesselsch.,* **65,** 1880-1889.

KUHN R. et LEDERER E., 1932. Iso-carotin (Über das Vitamin des Wachstums III). *Ber. Dtsch. Chem. Gesselsch.,* **65,** 637-640.

KUHN R. et GRUNDMANN C., 1933. Über Kryptoxanthin, ein Xanthophyll der Formel $C_{40}H_{56}O$ (Über das Vitamin des Wachstums V). *Ber. Dtsch. Chem. Gesselsch.,* **66,** 1746.

LABORIE M. E., 1963. Contribution à l'étude des actions de la gibbérelline et du chlorure de chlorocholine sur le métabolisme des pigments foliaires. II. Actions de la gibbérelline et du C. C. C. sur les teneurs et sur les vitesses de renouvellement des pigments chloroplastiques. *Ann. Physiol. vég.,* **5,** n° 2, 89-113.

LATIMER P. et RABINOWITCH E., 1956. Selective scattering of light by pigment-containing plant cells. *J. Chem. Physics,* **24,** 480.

LATIMER P. et RABINOWITCH E., 1959. Selective scattering of light by pigments *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 428-441.

LEFORT M., 1959. Étude de quelques mutants chlorophylliens induits chez *Lycopersicum esculentum*. Analyse des pigments et de l'infrastructure des chloroplastes normaux et altérés. *Rev. Cyt. Biol. vég.*, **20**, 1-159.

LICHTENTHALER H. K. et PARK R. B., 1963. Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach. *Nature*, **198**, 1070-1072.

LIPPMAA T., 1926. Über den vermuteten Rhodoxanthingehalt der Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Gesselsch.*, **44**, 643-648.

LUNDEGARDH H., 1963. Spectral changes of chloroplast pigments in relation to oxygen, light and substrates. *Physiol. Plantar.*, **16**, 442-453.

LUNDEGARDH H., 1964. The effect of light on chloroplast carotenoids. *Physiol. Plantar.*, **17**, 482-491.

LYNEN F., AGRANOFF B. W., EGGERER H., HENNING U. et MÖSLEIN E. M., 1959. γγ-dimethyl-allyl-pyrophosphat und Geranyl-pyrophosphat, biologische Vorstufen des Squalens. Zur Biosynthese der Terpene. VI. *Angew. Chem.*, **71**, 657-663.

LYNEN F. et HENNING U., 1961. The biological route to natural rubber. *Angew. Chem. Internat. Edit.* Sample Issue, 9-19.

MAC KINNEY G., 1935. Leaf carotene. *J. Biol. Chem.*, **3**, 75-84.

MAC KINNEY G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, U. S. A., **140**, 315-322.

MAC KINNEY G., NAKAYAMA T., BUSS C. D. et CHICHESTER C. O., 1952. Carotenoïd production in *Phycomyces*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 3456-3457.

MAC KINNEY G., NAKAYAMA T., CHICHESTER C. O. et BUSS C. D., 1953. Biosynthesis of carotene in *Phycomyces*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 236-238.

MAC KINNEY G., CHICHESTER C. O. et WONG P. S., 1954. On carotenoid synthesis in *Phycomyces blakesleanus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **53**, 479-483.

MARTIUS C., 1961. In : *Ciba Foundation Symposium on quinones in electron transport* J. A. Churchill Ltd. Recent investigations on the chemistry and function of vitamin K, 312-326.

MASE Y., 1959. Biosynthesis of carotenoïds by fungi. *J. of Vitaminology*, **5**, 161-177.

MERCER E. I. et GOODWIN T. W., 1962. The incorporation of (2-^{14}C) mevalonic acid and $^{14}CO_2$ into the phytyl side chain of chlorophyll in maize seedlings. *Biochem. J.*, **85**, 13 P.

MERCER E. I., DAVIES B. M. et GOODWIN T. W., 1963. Studies in carotenogenesis. A. Attempts to detect lycopersene in higher plants. *Biochem. J.*, **87**, 317-325.

MOSTER J. B., QUACKENBUSH F. W. et PORTER J. W., 1952 *a*. The carotenoids of corn seedlings. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **38**, 287-296.

MOSTER J. B. et QUACKENBUSH F. W., 1952 *b*. The effects of temperature and light on the carotenoids of seedlings from three corn hybrids. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **38**, 297-300.

NASH H. A., QUACKENBUSH F. W. et PORTER J. W., 1948. Studies on the structure of ζ-carotene. *J. A. C. S.*, **70**, 3613-3615.

NISHIMURA N. et CHANCE B., 1963. Studies on the electron transfer systems in photosynthetic bacteria. I. The light induced absorption spectrum changes and the effect of phenylmercuric acetate. *Biochem. Biophys. Acta*, **66**, 1-16.

OLSON J. A. et KNIZLEY H., 1962. The effect of diphenylamine on carotenoid, sterol and fatty acids synthesis in *Phycomyces blakesleanus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 138-145.

PARKER R. E. et ISAACS N. S., 1959. Mechanisms of epoxide reactions. *Chem. Reviews*, **59**, 737-799.

PETERSON P. J., 1963. The occurence of rhodoxanthin in red leaved seedlings of *Agatha australis*. *J. Exp. Bot.*, **14**, 1.

POPJAK G. et CONFORTH J. W., 1960 *a*. The biosynthesis of cholesterol. *Adv. Enzym.*, **22**, 281-335.

POPJAK G. et CORNFORTH R. H., 1960 *b*. Gas liquid chromatography of allylic alcohols and related branched chain acids. *J. Chromatogr.*, **4**, 214-221.

PORTER J. W. et LINCOLN R. E., 1950. *Lycopersicon* selections containing a high content of carotenes and colorless polyenes. The mechanism of carotene biosynthesis. *Arch. Biochem.*, **27**, 390-403.

PORTER J. W. et ANDERSON D. G., 1962. The biosynthesis of carotenes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 520-528.

PULLMAN B. et PULLMAN A., 1963. *Quantum biochemistry*. Interscience Publishers-New York.

PURCELL A. E. et THOMPSON G. A., 1961. Glucose as a carbon source for carotenes synthesis in tomatoes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 231-237.

RABOURN W. J. et QUACKENBUSH F. W., 1953. The occurence of phytoene in various plant materials. *Arch. Biochem. Biophys.*, **44**, 159-164.

RILLING H., TCHEN T. T. et BLOCH K., 1958. On the mechanism of squalene biogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **44**, 167-173.

ROUX E. et HUSSON C., 1952 *a*. Pigments des chloroplastes et photosynthèse. *C. R. Acad. Sci.*, **235**, 1154-1155.

ROUX E. et HUSSON C., 1952 *b*. Pigments des chloroplastes et photosynthèse. *C. R. Acad. Sci.*, **234**, 1573.

RUZICKA L. et FIRMENICH G., 1939. Zur Kenntnis der Diterpene. XXXVII. Synthese des aliphatischen Diterpenalkohols Geranyl-geraniol. *Helv. Chim. Acta*, **22**, 392.

RUZICKA L., 1953. The Isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, **9**, 357-367.

SAAKOV V. S., 1963. The mechanism of violaxanthin variation during the light reaction of chloroplasts. *Doklad. Akad. Nauk S. S. S. R.*, **148**, 1412-1414.

SACCONE M., 1959. *Étude de la croissance et de l'évolution des pigments de l'*Hoematococcus pluvialis *en fonction de différents facteurs.* Diplôme d'Études Supérieures de Sciences Naturelles. Paris, 31 p.

SAPOZHNIKOV D. I., BRONSTEIN-POPOVA I. A., KRASOVSKAIA T. A. et MAIEVSKAIA A. N., 1956. Détermination quantitative des caroténoïdes dans les feuilles vertes par chromatographie sur papier. *Fiziol. Rastenii*, **3**, 487-489.

SAPOZHNIKOV D. I., KRASOVSKAIA T. A. et MAIEVSKAIA A. N., 1957. Modifications des rapports entre les caroténoïdes fondamentaux des plastides des feuilles vertes sous l'influence de la lumière. *Dokl. Akad. Nauk S. S. S. R.*, **113**, 465-467.

SAPOZHNIKOV D. I. et BAZHANOVA N. V., 1958. Caractéristiques de la réaction à la lumière dans les chloroplastes isolés. *Dokl. Akad. Nauk S. S. S. R.*, **120**, 1141-1143.

SAPOZHNIKOV D. I. et ALKASOV D. G., 1961. The assimilation of ^{18}O from heavy oxygen water into violaxantin when the plant is exposed to the action of light. *Bot. Zhur.*, **46**, 673-676.

SCHOPFER W. H. et GROB E. C., 1950. Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un microorganisme. *Experientia*, **6**, 419.

SCHOPFER W. H. et GROB E. C., 1952. Sur la biosynthèse du β-carotène par *Phycomyces* sur un milieu contenant de l'acétate de sodium comme unique source de carbone. *Experientia*, **8**, 140.

SCHOTZ F., 1962. Pigmentanalytische untersuchungen an *Oenothera*. I. Vorversuche und analyse der blätter und blüten von *Oenothera suaveolens* DESF, mutante « Weissherz ». *Planta*, **58**, 411-434.

SCHRAM E., 1963. *Organic scintillation detectors.* Elsevier Publ. Comp.,Amsterdam, London, New York.

SHILLOV E. A., 1957. *Emploi du* ^{14}C *a l'étude des mécanismes de biosynthèse du caoutchouc et des produits formés en même temps que lui dans le* kok-sagyz. Conf. Intern. sur les Radioisotopes dans la Rech. Scient. UNESCO. Abstract, 130.

SHLYK A. A. et GODNEV T. N., 1958. *Interrelation of chlorophyll components and carotenoids in biosynthesis*, in *Radioisotopes in scientific research*, vol. IV, 479-493, Pergamon Press, London, N. Y., Paris, Los Angeles.

SHLYK A. A., KALER V. L. et PODCHUFAROVA G. M., 1961. Protochlorophyllide in green plants. V *Internat. Biochem. Congr.*, Moscou, p. 456.

SHNEOUR E. A. et CALVIN M., 1962. Isotopic oxygen incorporation in xanthophylls of *Spinacea oleracea* quantasomes. *Nature*, **196**, 439-441.

SIGNOL M., 1958. Modifications cytologiques et pigmentaires induites par l'acide 3-(α-iminoéthyl)-5 méthyl tétronique chez le maïs. *Qual. Plantar et Mat. Vegetabil.*, **3**, 360-367.

SIRONVAL C. et KANDLER O., 1958. Photooxidation processes in normal green *Chlorella* cells. I. The bleaching process. *Bioch. Biophys. Acta*, **29**, 359-368.

SMITH L. et RAMIREZ J., 1959. Absorption spectrum changes in photosynthetic bacteria following illumation or oxygenation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 233-244.

SMITH L. et RAMIREZ J., 1960. Relations of carotenoid pigments in photosynthesis bacteria. *J. Biol. Chem.*, **235**, 219-225.

SPRECHER VON BERNEGG A., HEURLE E. und AMALSY F., 1935. Spektrophotometrische Bestimmung von chlorophyll *a*, Chlorophyll *b*, Carotin und Xanthophyll. *Biochem. Z. Dtsch.*, **283**, 45-52.

STANIER R., 1959. *Carotenoid pigments : problems of synthesis and function. Harvey Lectures*, **54**, 219-255.

STEELE W. J. et GURIN S., 1960. Biosynthesis of β-carotene in *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2778-2785.

STOKES G. G., 1864. On the application of the optical properties of bodies to the detection and discrimination of organic substances. *J. Chem. Soc.*, G. B., **17**, 304-318.

STOLL A. et WIEDEMAN E., 1959. Die Kristallisierten naturlichen Chlorophylle *a* und *b*. *Helv. Chim. Acta*, **42**, 3, 679-683.

STRAIN H. H., 1948. Leaf xanthophylls. *J. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 1672.

STRAIN H. H., 1954. Leaf xanthophylls : the action of acids on violaxanthin, violeoxanthin, taraxanthin and tareoxanthin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **48**, 458-468.

STRAIN H. H., 1958. *Chloroplast pigments and chromatographic analysis.* 32th Annual Priestley Lectures, 180.

STRAUS W., 1956. Isolation of chromoplasts from carrots. *Exptl. Cell Res.*, **11**, 289-296.

SUZUE G., 1960. Enzymic synthesis of bacterial phytoene from (2-^{14}C) mevalonic acid. *Bioch. Biophys. Acta*, **45** 616-617.

SUZUE G., 1961. Enzymic conversion of bacterial phytoene into δ-carotene. *Bioch. Biophys. Acta*, **50**, 593-594.

TALALAY P. 1957. Enzymatic mechanisms in stéroid métabolism. *Physiol Rev.*, **37**, 362-389.

TISCHER J., 1936. Über das Euglenarhodon andere und Carotinoide einer roterm Euglene (Carotinoïde der Sübwasseralgen, I Teil.). Hoppe-Seyler's. *Z. Physiol. Chem.*, **239**, 257-269.

TISCHER J., 1937. Über die Carotinoïde und die Bildung von Jonon in Trentepohlia nebst Bermerkungen über den Gehalt dieser Alge an Erythrit. (Carotinoïde der Sübwasseralgen, II Teil.). Hoppe Seyler's. *Z. Physiol. Chem.*, **243**, 103-118.

TOMES M. L., 1963. Temperature inhibition of carotene synthesis in tomato. *Bot. Gaz., U. S. A.*, **124**, 180-185.

TSWETT M., 1911. Über den makro und mikrochemischen Nachweis des Carotins. *Ber. Deutschen Botan. Gesellsch.*, **29**, 630-636.

VARMA T. N. R. et CHICHESTER C. O., 1962 *a*. Incorporation of Δ^3-Isopentenyl pyrophosphate into lycopene in Tomato homogenate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 265-269.

VARMA T. N. R. et CHICHESTER C. O., 1962 *b*. Incorporation of citral ^{14}C and geraniol ^{14}C into β-carotene in carrot root slices : interconversion of citral and geraniol in carrot root slices and by alcohol dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 419-422.

VESSEREAU A., 1945. *Méthodes statistiques en biologie et en agronomie*. Baillère éd., Paris.

WACKENRODER H., 1831. Ueber das *Oleum radicis Dauci aetherum*, das Carotin, den Carotenzucker und den officinellen succus Dauci, sowie auch über das Mannit, welches in dem Möhrensafte duch ein besondere Art der Gährung gebildet wird. *Magazin für Pharmacie, Dtsch.*, **33**, 144-172.

WAGNER-JAUREGG T., 1932. Synthesis of terpenes from isoprene. *Liebigs Ann.*, **496**, 52.

WARBURG O. et KRIPPAHL G., 1955. Carotenoids as functionnal groups of a photosynthesis enzyme. *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, II, **60**, 69-72.

WARBURG O., KRIPPAHL G., GEWITZ M. G. et VÖLKER W., 1958. Carotenoid oxygenase in *Chlorella*. *Z. Naturforschung, Dtsch.*, **13 B**, 437-439.

WEIGL J. W. et LIVINGSTON R., 1953. Infrared spectra of chlorophyll and related compounds. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 2173-2176.

WHITMORE R. A., 1944. Light and pigment development in the kidney bean. *Plant Physiology*, **19**, 569-578.

WINTERSTEIN A., 1960. « Résultats récents de Recherches sur les caroténoïdes ». *Angew. Chem.*, **72**, 902-910.

WINTERSTEIN A. et HEGEDUS B., 1960. Nachweis biologisch aktiver Aldehyde. *Chimia*, **14**, 9.

YAMAMOTO H. Y., YOKOYAMA H., SIMPSON K., NAKAYAMA T. O. M. et CHICHESTER C. O., 1961. Incorporation of 5, 10, 15 ^{14}C farnesol pyrophosphate into *Phycomyces* carotenoids. *Nature*, **191**, 1299-1300.

YAMAMOTO H. Y., CHICHESTER C. O. et NAKAYAMA T. O. M., 1962 *a*. Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophyll. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 168-173.

YAMAMOTO H. Y., CHICHESTER C. O. et NAKAYAMA T. O. M., 1962 *b*. Biosynthetic origin of oxygen in the leaf xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 645-649.

YAMAMOTO H. Y., CHICHESTER C. O. et NAKAYAMA T. O. M., 1962 *c*. Xanthophylls and the Hill reaction. *Photochem. and Photobiol.*, **1**, 53-57.

YOKOYAMA H., CHICHESTER C. O. et MAC KINNEY G., 1960. Formation of carotene *in vitro*. *Nature*, **185**, 687-688.

YOKOYAMA H., NAKAYAMA T. O. M. et CHICHESTER C. O., 1962. Biosynthesis of β-carotene by cell free-extracts of *Phycomyces blakesleanus*. *J. Biol. Chem.*, **237**, 681.

ZABIN I., 1957. The formation of radioactive lycopene in ripening tomatoes. *J. Biol. Chem.*, **226**, 851-859.

ZEICHMEISTER L. et PINCKARD J. H., 1948. On naturally occuring colorless polyenes. *Experientia*, **4**, 474-475.

ZEICHMEISTER L. et KARMAKAR G., 1953. The occurence of phytofluene in green plant organs. *Arch. Biochem. Biophys.*, **47** 160-164.

ZEICHMEISTER L., 1960. *Fortschritte der Chemie Organisches Waturstoffe*, Wien, Springer-Verlag, XVIII, 223-349.

ZSCHEILE F. P., WHITE J. W., BEADLE B. W. et ROACH J. R., 1942. The preparation and absorption spectra of five pure carotenoid pigments. *Plant Physiol.*, **17**, 331-346.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LES QUINONES DES CHLOROPLASTES

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 16 novembre 1964

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Marc ZAMANSKY

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 3-1965.

Dépôt légal : 4e trimestre 1964. *N° d'impression : 998.*